

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ MÉNĚ ZNÁMÝCH DRUHŮ OVOCE Z HLEDISKA OBSAHU
VITAMINU C

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VERONIKA MAŘÁKOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

SROVNÁNÍ MÉNĚ ZNÁMÝCH DRUHŮ OVOCE Z HLEDISKA OBSAHU VITAMINU C

COMPARISON OF VITAMIN C CONTENT BETWEEN LESS KNOWN KINDS OF FRUIT

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. VERONIKA MAŘÁKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

RNDr. MILENA VESPALCOVÁ, Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0391/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Veronika Mařáková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.	
Konzultanti:	prof. Ing. Vojtěch Řezníček, CSc.	

Název diplomové práce:

Srovnání méně známých druhů ovoce z hlediska obsahu vitamínu C

Zadání diplomové práce:

Teoretická část:

- 1) Stručná charakteristika vybraných méně známých druhů ovoce
- 2) Vitamin C - chemické vlastnosti a význam pro lidské zdraví
- 3) Přehled metod stanovení vitamínu C

Experimentální část:

- 1) Ověření vybraného postupu stanovení vitamínu C na standardech
- 2) Stanovení vitamínu C ve vybraných druzích ovoce
- 3) Vyhodnocení získaných výsledků a porovnání analyzovaných druhů ovoce z hlediska obsahu vitamínu C

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Veronika Mařáková
Student(ka)

RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením obsahu vitamínu C v různých odrůdách dřínu obecného (*Cornus mas*) a jeřábu obecného (*Sorbus aucuparia*).

V teoretické části jsou popsány botanické charakteristiky obou rostlin, rozšíření na území ČR a ve světě, způsoby rozmnožování, obsah zdravotně významných látek a význam obou rostlin v potravinářství. Pozornost je soustředěna na vitamin C, který se v jejich plodech nachází ve vysokém množství. Závěr teoretické části se zabývá různými metodami stanovení vitamínu C.

Cílem experimentální části bylo porovnat obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách dřínu a jeřábu. Zvolená metoda stanovení vitamínu C vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detekcí byla nejdříve ověřena na standardech. Poté byly stanoveny vybrané validační parametry této metody. Validovaná metoda byla použita ke stanovení obsahu vitamínu C v devíti odrůdách dřínu obecného a v šesti odrůdách jeřábu. Pro porovnání bylo také na některých vzorcích testováno stanovení celkového vitamínu C po redukci kyseliny dehydroaskorbové za pomoci dithiothreitolu (DTT).

ABSTRACT

This thesis deals with the determination of vitamin C in different varieties of cornelian cherry (*Cornus mas*) and mountain ash (*Sorbus aucuparia*).

The theoretical part describes the botanical characteristics of both plants, the extension in the CZ and in the world, methods of reproduction, the content of meaningful health substances and the importance of both plants in food-processing industry. Attention is paid to vitamin C, which is in their fruits in high quantity. Conclusion of the theoretical part discusses various methods of determination of vitamin C.

The aim of the experimental part was to comparison of the vitamin C content in different varieties cornelian cherry and mountain ash. The chosen method for the determination of vitamin C by high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection was first tested on standards. Selected validation parameters of this method was then determined. Validated method was used to determine the content of vitamin C in nine varieties cornelian cherry and six varieties of the mountain ash. For comparison were also tested some samples of the determination of total vitamin C after reducing dehydroascorbic acid by using dithiothreitol (DTT).

KLÍČOVÁ SLOVA

vitamin C, dřín obecný, *Cornus mas*, jeřáb obecný, *Sorbus aucuparia*, HPLC

KEYWORDS

vitamin C, cornelian cherry, *Cornus mas*, mountain ash, *Sorbus aucuparia*, HPLC

MAŘÁKOVÁ, V. *Srovnání méně známých druhů ovoce z hlediska obsahu vitamínu C*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 71 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla poděkovat především své vedoucí RNDr. Mileně Vespalcové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, cenné rady a připomínky, které mi poskytovala v průběhu řešení diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Jitce Cetkovské za poskytnutí důležitých rad při realizaci měření.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
	TEORETICKÁ ČÁST	8
1.1	DŘÍN OBECNÝ – <i>CORNUS MAS</i>	8
1.1.1	<i>Stanoviště a rozšíření</i>	10
1.1.2	<i>Rozmnožování, výsadba a sklizeň</i>	11
1.1.3	<i>Odrůdy a jejich charakteristika</i>	12
1.2	CHEMICKÉ LÁTKY OBSAŽENÉ PLODECH DŘÍNU OBECNÉHO	13
1.2.1	<i>Vitaminy obsažené v dřincích</i>	14
1.2.2	<i>Kyselé složky.....</i>	15
1.2.3	<i>Trpké látky.....</i>	16
1.2.4	<i>Bílkoviny.....</i>	17
1.2.5	<i>Přírodní barviva - anthokyany</i>	17
1.2.6	<i>Minerální látky v dřínkách</i>	18
1.3	VYUŽITÍ PLODŮ.....	20
1.4	JEŘÁB – <i>SORBUS L</i>	21
1.4.1	<i>Popis rostliny.....</i>	21
1.4.2	<i>Chemické složení a využití.....</i>	23
1.5	VITAMIN C	24
1.5.1	<i>Dehydrokyselinová kyselina</i>	25
1.5.2	<i>Použití askorbové kyseliny v potravinářství</i>	25
1.5.3	<i>Zdroje vitamínu C.....</i>	26
1.5.4	<i>Reakce</i>	28
1.5.5	<i>Změny</i>	29
1.5.6	<i>Vliv vitamínu C na organismus člověka</i>	32
1.5.7	<i>Doporučená denní dávka.....</i>	33
1.6	POPIS METODY STANOVENÍ VITAMINU C POMOCÍ VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE	34
1.6.1	<i>Veličiny používané k popisu chromatografické analýzy</i>	35
1.6.2	<i>Instrumentace kolonové kapalinové chromatografie.....</i>	36
1.7	STANOVENÍ VITAMINU C.....	39
1.7.1	<i>Metoda HPLC/UV</i>	39
1.7.2	<i>Další metody stanovení vitamínu C.....</i>	40
1.8	VALIDAČNÍ PARAMETRY	42
1.8.1	<i>Linearita</i>	42
1.8.2	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	42
1.8.3	<i>Opakovatelnost.....</i>	43
1.8.4	<i>Výtěžnost metody (správnost)</i>	43

2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1	POUŽITÉ POMŮCKY	44
2.2	PŘÍSTROJE	44
2.3	CHEMIKÁLIE	44
2.4	STANOVENÍ VITAMINU C NA STANDARDECH	45
2.4.1	<i>Příprava roztoků</i>	45
2.5	STANOVENÍ VITAMINU C V PLODECH DŘÍNU OBECNÉHO	45
2.6	STANOVENÍ VITAMINU C V PLODECH JEŘÁBU OBECNÉHO	46
2.7	STANOVENÍ CELKOVÉHO VITAMINU C – REDUKCE KYSELINY DEHYDROASKORBOVÉ NA ASKORBOVOU	46
2.7.1	<i>Příprava roztoků</i>	46
3	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
3.1	STANOVENÍ VALIDAČNÍCH PARAMETRŮ	47
3.1.1	<i>Linearita odezvy detektoru</i>	47
3.1.2	<i>Mez detekce a mez stanovitelnosti</i>	48
3.1.3	<i>Opakovatelnost měření</i>	49
3.1.4	<i>Výtěžnost</i>	50
3.2	STANOVENÍ VITAMINU C VE VYBRANÝCH DRUŽÍCH OVOCE	51
3.2.1	<i>Stanovení vitamínu C v plodech dřínu obecného</i>	51
	<i>Sestrojení kalibrační závislosti</i>	51
	<i>Stanovení vitamínu C v různých odrůdách dřínu obecného</i>	52
3.2.2	<i>Stanovení vitamínu C v plodech jeřábu obecného</i>	55
3.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO VITAMINU C – REDUKCE DEHYDROASKORBOVÉ KYSELINY NA ASKORBOVOU KYSELINU	57
4	ZÁVĚR	59
5	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	60
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	63
7	SEZNAM PŘÍLOH	64
8	PŘÍLOHY	65

1 ÚVOD

V dnešním uspěchaném světě se lidé čím dál častěji vrací ke zdrojům přírody, protože ne vždy to, co vynalezl člověk synteticky, nám může pomoci do takové míry, jak bychom chtěli a potřebovali. A právě v tuto chvíli přichází původní osvědčené recepty a praktiky, které zapojují do svého působení celý komplex látek. Do této skupiny řadíme také různé rostliny a byliny, které člověka provází odnepaměti. Patří sem určitě i méně známé ovoce. V mnoha případech se upustilo od jeho pěstování většinou z praktických důvodů, ke kterým patří například zdlouhavá výsadba či pracná sklizeň nebo i specifické a náročné podmínky pro pěstování. Naštěstí díky pěstitelům a šlechtitelům se k tomuto ovoci stále častěji více lidí vrací.

Do skupiny u nás se vyskytujícího méně známého ovoce patří i keř dřín obecný (*Cornus mas*). Do České republiky se dostal z východu, kde ho můžeme nalézt v početnějším množství. U nás se vyskytuje převážně pouze na dvou místech, a to na střední a jižní Moravě a ve středních a severozápadních Čechách. Patří k rostlinám, které začínají tvořit brzy na jaře pestré žluté květy, které jsou důležitým prvním zdrojem potravy pro včely. Občas ho můžeme nalézt i v parcích, kde slouží především k dekorativním účelům a je také využíván pro tvorbu živých plotů. Nás však zajímá kvůli jeho plodům, které dozrávají na konci léta či začátkem podzimu. Tyto takzvané dřínky velikostí i tvarem připomínající olivy, ovšem sytě až tmavě červené barvy, konzumenty překvapí svou svěží sladkokyselou chutí, které nám navíc dodají i spoustu zdraví prospěšných látek. A to především vitamin C, který se zejména v čerstvých bobulích nachází ve velkém množství. Z dalších biologicky aktivních látek je zde možno nalézt různé druhy anthokyanů neboli přírodních barviv, cukry anebo vlákninu důležitou pro zažívací soustavu. Proto je úplně nejlepší varianta dřínky konzumovat čerstvé, ostatně jak jakékoli jiné ovoce či zeleninu. Naštěstí i po tepelné úpravě, ať už přípravou různých zavařenin, marmelád nebo sirupů, si ponechává stále vysoký obsah vitamínu C.

Další rostlina, také keř, který patří do skupiny méně známého ovoce, je jeřáb obecný (*Sorbus aucuparia*). Tento keř, někdy i strom, narozdíl od dřínu vykvétá pozdě, a proto jsou jeho květy chráněny před pozdními jarními mrazíky. Nejvíce vitamínu C plody obsahují ve fázi biologické zralosti, což je asi v polovině září, ale v té době jsou velmi kyselé. Bohužel by se tyto plody neměly konzumovat ve větším množství za surového stavu kvůli obsahu toxických látek, ke kterým patří kyseliny parasorbinová a amygdalin. Po tepelné úpravě dojde k odstranění těchto nežádoucích látek, což se může využít k přípravě různých pokrmů nebo například jako dochucovadlo do omáček, kde si i přes tepelnou úpravu toto ovoce stále udržuje velký podíl obsaženého vitamínu C.

Ke stanovení vitamínu C bylo publikováno mnoho metod, pozornost je věnována především metodě HPLC a způsobům extrakce tohoto hydrofilního málo stabilního vitamínu, k jehož ztrátám dochází nejčastěji působením tepla, kyslíku a za katalýzy kovů. V této práci bylo porovnáno množství vitamínu C ve vybraných odrůdách méně známého ovoce, které bylo stanoveno pomocí HPLC za použití extrakčního činidla a mobilní fáze dané normou ČSN EN 14130 z roku 2004 [1].

TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Dřín obecný – *Cornus mas*

Popis rostliny

Odborné jméno keř dostal dle latinského slova cornu, které je ekvivalentem našeho slova roh. Vysvětluje nám to citace z Matthioliho herbáře, který z italštiny přeložil známý český botanik a lékař Tadeáš Hájek z Hájku, kde se doslovně píše : "Dřínkový strom latině od rohu jméno má, protože jako roh jeho dřevo tvrdé jest." Z tohoto důvodu bylo dřevo dřínu, zejména v minulosti, velmi ceněno v řezbářství. [2]

Dřín patří mezi okrasné a velmi dekorativní dřeviny zvláště v předjaří, kdy vykvetá. Dřín drží po tisíciletí primát ve vítání jara. V této době je svým kvetením a tvorbou velkého množství pylových zrn důležitou oporou včelám, které potřebují při prvních jarních přeletech vydatnou potravu. Čtyřčetné květy, rozvíjející se před rašením listů, mají čtyři nepatrné kališní zoubky ve tvaru pravidelného trojúhelníku, čtyři volné žluté korunní lístky a tyčinky se žlutými prašníky. Celý dojem je žlutavý; květy jsou uspořádány do mnohokvětých (14–25) okolíčnatých květenství. Plody jsou sytě rudé soudečkovité dřínky, asi 15 mm dlouhé (u velkoplodých kultivarů větší) peckovice. Mají sladkokyselou, trochu svíravě natrpklou chuť a obsahují 8–9 % cukrů a 2–3 % volných kyselin, hlavně kyseliny jablečné. Připravují se z nich džemy, kompoty a ovocné víno. Pevné dřevo sloužilo např. k výrobě ozubí mlýnských soustrojí, borka s obsahem 7–16 % tříslovin se používala k vydělávání kůží. [2, 3]

Jeho přednosti jsou pro drobné pěstitele i pro velkovýrobní pěstování nesporné. Dřín bohatě a pravidelně plodí, sklizeň lze mechanizovat (vibrací nebo střásáním plodů), založená výsadba je při minimálním ošetření dlouhověká, v plné plodnosti přečká mnoho generací a keře téměř nevymrzají. Dřín má bohatý kořenový systém, který zpevňuje půdu zvláště na svazích a zabraňuje tak erozivní činnosti. Dá se pěstovat i v extrémně suchých půdách. Není nezanedbatelný ani jeho význam pro včely a vůbec jako perspektivní ovocné dřeviny přinášející ovoce s vysokou biologickou hodnotou vhodné pro přímý konzum i v čerstvém stavu i pro zpracovatelské účely. Vedle ekonomického efektu je také tato dlouhověká dřevina bezesporu přínosem ke zlepšení životního i přírodního prostředí v ekologicky poškozených oblastech. [2]

Tento rod zahrnuje asi čtyřicet druhů opadavých keřů, ojediněle stromů, rozšířených v mírném pásmu severní polokoule. V našich parcích a sadech často nalezneme svídu bílou (*Cornus alba* L.), dřín květnatý (*Cornus florida* L.), svídu obecnou (*Cornus sanguinea* L.) a zejména dřín obecný (*Cornus mas* L.), který nás z ovocnářského hlediska zajímá nejvíce. [2]



Obr. č. 1: Cornus mas (Dřín obecný) [4]

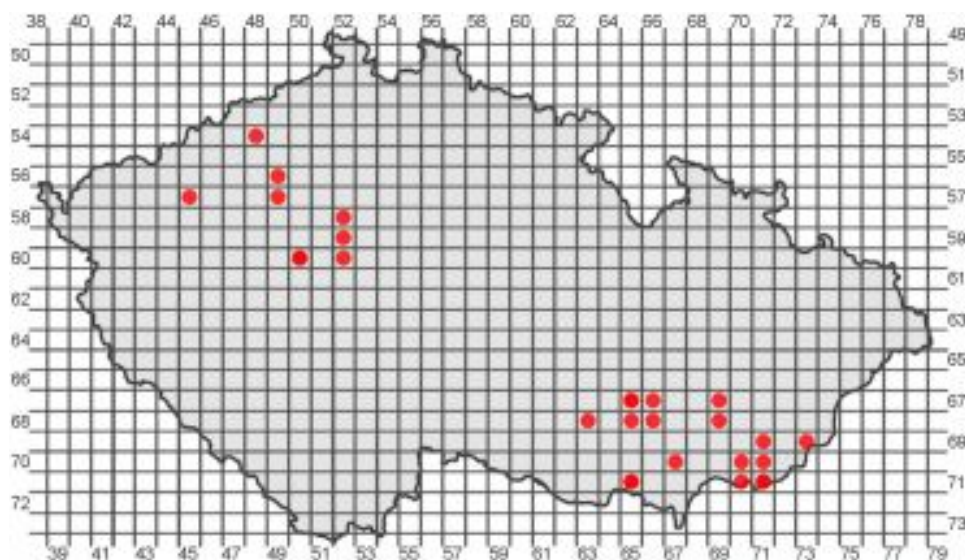


Obr. č. 2: Květy dřínu obecného [5]

1.1.1 Stanoviště a rozšíření

Dřín je sice teplomilná ovocná dřevina, ale ve dřevě i v období květu je velmi mrazuvzdorný. Dřínu se dobře daří na výslunných sušších rovinatých i svažitých plochách, které se pro jiné ovocné druhy nehodí. Půda má být písčitohlinitá až hlinitopísčítá s neutrální až alkalickou (zásaditou) reakcí. Vyskytuje se často na vápencových podkladech. Dřín je náročný na teplo a světlo, a proto dáváme přednost svahům orientovaným na jih, jihovýchod nebo jihozápad. S úspěchem lze dřín pěstovat i v nadmořské výšce kolem 600 m, zvláště jde-li o mikroklimaticky příznivou polohu. Nevhodné jsou např. zastíněné plochy u vysokých zdí, kde jsou keře řídké a velmi málo plodné. Také v kyselých půdách se dřínu nedaří. Okusem zvěře ani vážnějšími chorobami či škůdci dřín netrpí. [2]

Je to dřevina střední či spíše jižní Evropy, jejíž severní hranice bývá lokalizována do linie jižní Belgie, Lucembursko, střední Německo, Halič a jižní oblasti Ruska. Roste i na Krymu, Kavkaze a v Malé Asii, pěstuje se také v jižním Švédsku a po staletí v Anglii. V České republice se dřín obecný vyskytuje ve dvou oblastech. Jsou to střední a severozápadní Čechy a jižní a střední Morava, mezi nimi je rozsáhlá oblast bez výskytu druhu. V Čechách je nejčastěji zastoupen v Českém krasu, dolním Povltaví a v Českém středohoří, na Moravě hlavně v pahorkatinách lemujících moravské úvaly, v předhůří Českomoravské vrchoviny, v Moravském krasu a Jihomoravské pahorkatině. [3, 6]



Obr. č. 3: Mapka výskytu dřínu obecného v ČR [7]

1.1.2 Rozmnožování, výsadba a sklizeň

Dřín lze sice množit v semenech, tj. výsevem pecek, ale tímto způsobem získáme různorodé potomstvo. Navíc je semeno přeléhavé (s tzv. dvojitou dormancí – mechanickou i fyziologickou), takže klíčí až druhým rokem po jednorochní stratifikaci. Ušlechtilé typy dřínu proto množíme roubováním. Celkem dobře lze dřín množit hřížením nebo odkopky. I když dřín patří mezi hůře zakořeňující dřeviny, dá se množit i zelenými řízky. Řežeme je v červnu asi 150 cm dlouhé a ponecháváme jim jeden až dva páry vrcholových listů, spodní odstraníme. Ošetříme je práškovým stimulátorem a vysadíme do pařeniště, v němž jsme připravili směs prosetého kompostu, rašeliny a jemného písku. Do zakořenění řízky rosíme, mírně větráme a také stíníme proti slunečnímu úpalu. Nejlépe až zjara příštího roku vysazujeme zakořeněné rostliny do volné půdy. [2]



Obr. č. 4: Pecky dřínu [8]

Před výsadbou na trvalé stanoviště půdu hluboko zkypríme a zapravíme do ní kompost v dávce asi 5 kg na 1 m². Zejména na svazích je třeba vyhloubit jámy, které při výsadbě zaplníme kvalitní zeminou. Vzdálenost rostlin od sebe by měla činit 4–5 m. [2]

V příznivých podmínkách můžeme z dospělých keřů nebo stromů pravidelně sklízet 30 – 40 kg ovoce ročně. Plody, které zrají postupně od konce srpna do října, sklízíme v době, kdy jsou již vybarvené, ale ještě tvrdé. Nejlepší způsob sklizně je střásání dřínků na plachtu rozprostřenou na zemi. [2]

Dřínky mají velké množství – 700 mg – vitamínu C v 1 kg plodů. Vitamin C je v nich poměrně stálý. Vysoký podíl zůstává i v kompotech, džemech (až 50 mg ve 100 g výrobku). Dále obsahují třísloviny, dostatek minerálních látek, hlavně draslíku, vápníku, hořčíku a síry. Obsahují i provitamin A, dále organické kyseliny, pektiny a další cenné látky. Dřínky je možné také sušit. Sušená mletá dužnina se u zakavkazských národů používá na rožnění masa. Ze sušených dřínků se připravuje chutný čaj. Na Ukrajině se pálí „dernovka“, dřínková pálenka. Výborné jsou míchané kompoty z hrušek nebo jablek s dřínky a brusinkami nebo jeřábinkami, zvláště jako příloha ke zvěřině. [2]

1.1.3 Odrůdy a jejich charakteristika

Současné odrůdy „Devín“ a „Titus“ byly z jedenácti selekcí pocházejících z přírodních lokalit Vihorlat, Strážcovská hornatina a Moravské předhůří. Odrůda „Devín“ vyniká vysokou a pravidelnou plodností. Dřínky jsou velké, v technologické a konzumní zralosti jsou výrazně tmavočervené. Zrají již koncem srpna až začátkem září. [2]

K dalším odrůdám patří: Jaltský, Elegantní, Lukjanovský, Vyšegorodský, Vydubecký, Fruchtal, Jolico. Jednotlivé odrůdy se od sebe liší tvarem plodů, barvou, leskem i jejich kvalitou.

Na základě hodnocených znaků lze za perspektivní odrůdy doporučit: Lukjanovský, Vyšegorodský, Vydubecký. Odrůdu Jaltský jako silně rostoucí a ranou do poloh s kratším vegetačním obdobím, naopak odrůda Jolico vyžaduje dlouhé vegetační období, plody musí dokonale vyzrát, aby získaly požadovanou kvalitu. [9]

Lukjanovský

Dorůstá do výšky 3,3 m, tvoří vzpřímenou korunu se středním zahuštěním. Odrůda je vysoce odolná vůči poklesům teplot, suchu, plodí pravidelně s téměř každoroční vyrovnanou sklizní. V sedmém roce pěstování se sklizně pohybují od 12 do 22 kg na keř. Dozrává středně v termínu od 20. srpna do 15. září. Listy jsou celokrajné, oválně protáhlé, světleji zelené, zespodu v místech spojení nervatury ochmýřené. Plody jsou velké, dosahují 5,5 až 6,0 g, délka 30,6–34,0 mm, šířka 15,0–16,5 mm, tvar baňkovitý i hruškovitý, dužnina šťavnatá, tmavě červená se specifickým aromatem. Stopka dosahuje délky 15,0–17,0 mm. Pecka je vřetenovitá, zašpičatělá, krémové barvy, délky 18,5–19,6 mm, šířky 6,6–7,2 mm.

Chemické složení: Obsah cukrů 6,8–7,2 %, kyselin (celkový) 2,2–2,3 %, pektinů 0,6–1,1 %, vitamin C 70,7–95,3 mg na 100 g. [9]

Vyšegorodský

Dorůstá výšky 3,8 m, tvoří oválně pyramidální tvar koruny se středním zahuštěním, je vysoce odolnou odrůdou vůči poklesům teplot, plodí pravidelně, každoročně. Sklizeň v osmém roce pěstování dosahuje okolo 18 kg na keř. Dozrává velmi brzy, koncem července, začátkem srpna. Listy celokrajné, oválně protáhlé, světle zelené barvy s výraznou nervaturou. V úžlabí nervatury je typické ochmýření. Plody jsou oválně válcovitého tvaru, středně velké, dosahují 3,5 g, délka plodů 22,0–23,0 mm, šířka 13,5–14,9 mm. Tvar plodu je nestálý. Zralé plody jsou tmavě višňové barvy s lesklou, tenkou slupkou, kysele sladké chuti. Pecka je elipsovitá, dosahuje délky 15,5–16,2 mm, šířky 5,6–6,0 mm. Tvoří v průměru 11,1 % z celkové váhy plodu.

Chemické složení: obsah cukrů 5,8–6,8 %, kyselin 1,5–1,7 %, pektinů 0,60–0,85 %, vitaminu C 75,0–85,0 mg ve 100 g plodů.[9]

Vydubecký

Výška keře dosahuje okolo 3,7 m, tvoří spíše keřovitý, široce rozložitý tvar se střední hustotou. Vůči poklesům teplot i suchu je vysoce odolnou odrůdou. Plodnost je každoroční. Sklizeň v desátém roce pěstování dosahuje 15–20 kg na keř. Je ranou odrůdou, zraje od 5. srpna do 10. září. Listy jsou celokrajné, oválně protáhlé, světle zelené barvy, s výraznou nervaturou. Spodní strana listu v místech spojení nervatury je ochmýřená. Plody jsou velké, dosahují 4,0–4,8 g, délka plodu 26,0–28,0 mm, šířka 14,0–15,0 mm. Tvar plodu je oválně

hruškovitý, barva plodu je temně červená s lesklou slupkou, dužnina je šťavnatá, délka stopky se pohybuje od 15,0 do 17,0 mm. Pecka je vřetenovitého tvaru, zašpičatělá, krémové barvy, délky 17,5–18,5 mm, šířky 5,6–6,2 mm.

Chemické složení: obsah cukru 5,6–7,2 %, kyselin 1,5–1,7 %, pektinu 1,0–1,2 %, vitamínu C 93,8–100,7 mg ve 100 g plodů. [9]

1.2 Chemické látky obsažené plodech dřínu obecného

Voda

Voda tvoří nejčastěji 50 až 90 % hmotnosti surovin rostlinného a živočišného původu, a tedy i příslušných potravin, zbytek se nazývá sušina. Podle obsahu vody se potraviny někdy dělí na potraviny s vysokým, středním a nízkým obsahem vody. Množství vody v potravinách, resp. aktivita vody, zásadně ovlivňuje charakteristické organoleptické vlastnosti potravin (texturu, vůni, chuť, barvu) a také jejich údržnost, odolnost vůči mikrobiálnímu ataku, enzymové (biochemické) a neenzymové (chemické) reakce, ke kterým dochází během zpracování a při skladování. [2]

Tab. č. 1: Obsah vody v některých potravinách [2]

Potravina	Obsah vody [%]
banány	76
hrušky	83
jablka	85
broskve	89
jahody	90
pomeranče a citrony	86–87
sušené ovoce	12–25
čerstvá kořenová zelenina (mrkev, petržel)	90
zelí	92
hlávkový salát a rajčata	95
česnek	61–68
pór	83–89
cibule	89–93
obiloviny	9–14
bílý chléb z pšeničné mouky	35–36
žitný chléb	38–45

V ovoci a zelenině je obsažena voda jednak volná, tak vázaná na koloidy. Volná voda je ve šťávě buněk ovoce a zeleniny a v ní jsou rozpuštěny ostatní látky, které šťávy obsahují (cukr, kyseliny apod.).

Voda vázaná na koloidy tvoří okolo nich vodní obal, který je jejich neoddělitelnou částí. Vázaná voda se od volné liší: větší hustotou, nižším specifickým teplem, nezamrzá při nižších teplotách, vysušování se odstraňuje mnohem nesnadněji než volná voda, není rozpouštědlem pro látky, které se ve volné vodě snadno rozpouštějí.[2]

Vláknina

Je to soubor neškrobových polysacharidů, které jsou degradovatelné trávicími enzymy v horní části zažívacího traktu. Do vlákniny se počítá celulóza, lignin, hemicelulóza, pektinové látky, gumy a slizy. Většinou jsou nerozpustné ve vodě, nanejvýš bývají rozpustné koloidně. Ovoce se podílí na celkové spotřebě vlákniny asi ze 14 % a zelenina z 11 %.[2]

Sacharidy

Sacharidy obsažené v ovoci můžeme rozdělit na monosacharidy (glukosa, fruktosa), disacharidy (sacharosa), polysacharidy (škrob, celulóza, hemicelulóza, pektiny).

Glukosu (hroznový cukr) obsahují džinky v množství 4,1–4,5 %. Fruktosu (ovocný cukr), která je nejsladší a nejstravitelnější cukr, obsahují džinky 4,1–4,7 % a sacharózu vůbec neobsahují.[2]

Tab. č. 2: Obsah základních složek v džincích [2]

Základní složky [g.kg ⁻¹]						
voda	sušina	bílkoviny	lipidy	sacharidy	popeloviny	vláknina
870,0	130,0	8,0	1,6	140,0	6,0	14,0

Pektiny

Polysacharidy obsahující jako monomerní jednotky kyselinu galakturonovou, její estery a rhamnosu. Jsou rozšířeny v rostlinné říši; jsou vázány na polysacharidy buněčných stěn a tvoří tzv. buněčný tmel (střední lamelu). Vyrábějí se z řepných řízků, z jablek a citrusových plodů. Díky přítomnosti silně hydrofilních karboxylových skupin mají pektiny velkou schopnost vázat vodu a za určitých podmínek (pH, koncentrace Ca²⁺) vytvářejí gely. Toho se využívá v potravinářství (při výrobě marmelád), ve farmaceutickém průmyslu a v kosmetice.[2]

1.2.1 Vitaminy obsažené v džincích

Komplex vitaminů ovoce a zeleniny chrání lidský organismus v mnoha směrech, zejména působí proti hypovitaminozám a avitaminozám. Často dochází k synergismu, kdy se účinek jednotlivých složek znásobuje. Některé vitaminy mají další ochranné účinky, například i proti nádorovým onemocněním (tokoferol – vitamin E, kyselina askorbová – vitamin C, β-karoten). V této souvislosti je věnována pozornost úloze některých vitaminů (vitamin E, C), ale dalších složek v ochraně před agresivními účinky volných radikálů. Radikály jsou molekuly, atomy či ionty s nepárovými elektrony. K přirozeným radikálům patří např. kyslík (biradikál), některé oxidy dusíku (NO, NO₂). Nadbytek radikálů (často i vlivem znečištěného prostředí) může vést k tzv. oxidačnímu stresu a k poškození buněk.[2]

Vitamin A (retinol)

Působí protiinfekčně a antixeroftalmicky (proti šerosleposti), podílí se na biosyntéze glykoproteinů (slizniční epitel) a steroidů a na produkci rhodopsinu. Zabraňuje vysychání oční rohovky a zlepšuje zrak. Je potřebný pro zdárný vývin a růst. Vitamin A má také antikancerogenní účinky.

V ovoci a zelenině je vitamin A přítomný jen ve formě provitaminů. Hlavním provitaminem je β-karoten; α-karoten a γ-karoten jsou přítomny v menší míře. K jejich

přeměně na retinol dochází v játrech. Lidé s nemocí jater a diabetici mají proto sníženou schopnost využít karoten jako provitamin A.[2]

Vitamin B1 (thiamin)

Působí proti poruchám nervového systému, jako kofaktor enzymů se účastní přeměny sacharidů, tuků a aminokyselin. Jeho příjem v naší stravě je na hranici nedostatku. Nedostatek se projevuje různými chorobami (choroba beri-beri, neuralgie, ischias, nechutenství). Na celkové denní dávce thiaminu se podílí zelenina ze 16,2 až 20,5 % a ovoce ze 5,7 až 7,4 %. Hlavním zdrojem thiaminu jsou játra, vepřové maso, kvasnice, obilné klíčky. Thiamin je vitamin poměrně nestálý, lehko se oksyduje.[2]

Vitamin B2 (riboflavin)

Je růstový činitel a podporuje oksydativní procesy v lidském těle. Jeho nedostatek vede k poruchám růstu nervových buněk, kůže, zapříčiňuje vypadávání vlasů. Avitaminóza je vzácná, riboflavin je v dostatečném množství v běžné potravě (mléko, potraviny rostlinného původu). Během vaření může dojít ke ztrátám až 60 %.[2]

Tab. č. 3: Obsah vitaminů [2]

Vitaminy v dřincích [mg.kg ⁻¹]			
A	B ₁	B ₂	C
0,50	0,20	0,30	700

1.2.2 Kyselé složky

Kyselost potravin souvisí s množstvím přítomných nedisociovaných a disociovaných kyselin, resp. oxoniových iontů.

Jako nositelé kyselé chuti (také bakteriostatický činitel a faktor ovlivňující řadu chemických reakcí) mají v potravinách hlavní význam nedisociované formy organických kyselin, především citronové a jablečné. Často se však uplatňují i další kyseliny, např. L-askorbová u většiny druhů ovoce, vinná u hroznů, isocitronová u ostružin, šťavelová u reвенě, mléčná u některých mléčných výrobků (např. jogurtů), mléčně kysaných okurek, zelí a oliv, octová u konzervářských zeleninových výrobků, propionová kyselina u sýrů typu Emmental. [2]

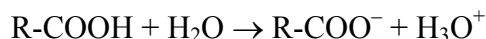
Kvalita a intenzita kyselé chuti

Jednotlivé kyseliny se v charakteru a často také v kvalitě kyselé chuti vzájemně liší. V jistých mezích se kyselin také liší prahové hodnoty vnímání kyselé chuti. [2]

Tab. č. 4: Prahové koncentrace významných kyselin [2]

Kyselina	Podnětový práh [mg.dm ⁻³]
octová	110
mléčná	200
jablečná	110
vinná	80
citronová	150

Méně významné pro vjem kyselé chuti jsou vodíkové kationty, resp. oxoniové kationty vzniklé disociací kyselin:



Množství oxoniových iontů, resp. hodnota pH biologických systému, je významným kritériem, neboť ovlivňuje oxidačně-redukční potenciál systému, probíhající enzymové i chemické reakce, růst mikroorganismů, má vliv na vůni, chuť a barvu potravin. Hodnota pH závisí na koncentraci kyselin, jejich disociačních konstantách a stupni neutralizace kyselin bazickými látkami.

Z různých důvodů (mikrobiologických, technologických aj.) je účelné rozlišovat potraviny na:

- velmi kyselá (jejich šťáva má $\text{pH} < 4,0$)
- málo kyselá (pH je v rozmezí 4,0-6,5)
- nekyselá ($\text{pH} > 6,5$)

Ovoce bývá až na výjimky vždy velmi kyselé. Nejvíce kyselin má ovoce v době před dozráním. Hodnota pH ovocných šťáv je převážně nižší než hraniční hodnota 4,0 (u přezrálých hrušek, třešní a broskví může vystoupit až na hodnotu pH 4,5, u přezrálých bezinek až na hodnotu 4,7). Obsah kyselin v ovoci bývá podle druhu zpravidla 10 až 30 g.kg^{-1} , méně kyselin (kolem 80 g.kg^{-1}) obsahují citrusové plody.

Často bývá kyselá chuť modifikována přítomností sacharidů, tříslovin, ethanolu nebo různých kationtů a jiných látek. Sacharidy chuťové účinky kyselin zeslabují, třísloviny a ethanol je naopak zesilují.

Čerstvá zelenina je na kyseliny ve srovnání s ovocem poměrně chudá. Její pH kolísá zpravidla od hodnoty 5,0 do 6,6. Z běžných zelenin je výjimkou pouze revec, kde se hodnota pH pohybuje kolem 3,2, poměrně kyselá jsou také rajčata (pH asi 4,3). Obsah kyselin v čerstvé zelenině se pohybuje nejčastěji mezi 2–4 g.kg^{-1} . [2]

Organické kyseliny, které můžeme najít v plodech dřínů obecného, jsou: **kyselina jablečná** – vyskytuje se ve všech druzích ovoce kromě citrusových plodů a klikvy a **kyselina salicylová** – vyskytuje se v dřincích jen ve velmi malém množství. [2]

1.2.3 Trpké látky

Primární příčinou trpké, svíravé nebo také adstringentní chuti jsou interakce proteinů slin s některými polymerními fenolovými sloučeninami přítomnými v potravinách rostlinného původu. Tyto interakce vedou k denaturaci proteinů slin, tím ke ztrátě jejich ochranného vlivu, v důsledku čehož dochází k interakci s proteiny ústní dutiny. Fenolové sloučeniny interagující s proteiny se souhrnně nazývají třísloviny nebo také tanniny. Třísloviny se dělí na dvě velké skupiny látek:

- hydrolyzované třísloviny
- kondenzované třísloviny.

Hydrolyzovatelné tanniny jsou polymery esterů gallové kyseliny čili polygalloylestery. Kondenzované třísloviny představují hlavně dimery, trimery a oligomery kyseliny chlorogenové, kávové a flavonových derivátů (katechinu, epikatechinu, proanthokyanidinu). Mezi zdroje trpké chuti patří zejména tanin, pyrogallol, kyselina hydroxybenzoová, skořicová,

katechiny a další. Vyskytují se však také prakticky libovolné kombinace kondenzovaných a hydrolyzovatelných tříslovin, které se nazývají komplexními tříslovinami.

Třísloviny mají jako přirozené složky potravin značný význam, neboť často podstatným způsobem ovlivňují žádoucí i nežádoucí chuťové vlastnosti potravin. Žádoucí je přiměřená trpkost např. u čaje, kávy, kaka (přidáním mléka nebo smetany se v důsledku interakce tříslovin s proteiny mléka trpkost odstraní), červených vín, piva aj. Nežádoucí trpkost vykazuje nezralé ovoce, např. banány. U některých nápojů, např. ovocných šťáv, piva a vína vznikají zákaly a sedimenty, na jejichž vzniku se účastní přítomně proteiny a třísloviny. Třísloviny se proto v takových případech odstraňují za použití aditivních látek, např. želatiny, polyamidů nebo polyvinylpyrrolidonu.[2]

Tab. č. 5: Třísloviny v ovoci [2]

Obsah tříslovin v ovoci [g.kg ⁻¹]		
jádrové ovoce, třešně a meruňky	bobulové ovoce, broskve a višně	trnky
0,1–2	1–4	20

1.2.4 Bílkoviny

Uvádějí se jako celkový obsah dusíkatých látek, případně jako tzv. hrubý protein. Rostlinné bílkoviny obsahují 62–90 % čistého proteinu. Výživové denní dávky přitom doporučují podíl rostlinných bílkovin 45–50 %. Malou část potřeby rostlinných bílkovin dodává zelenina, ještě menší ovoce. Bílkoviny rostlin se v lidském těle využívají jen částečně, jejich využitelnost se však zvyšuje kombinací s bílkovinami živočišnými.

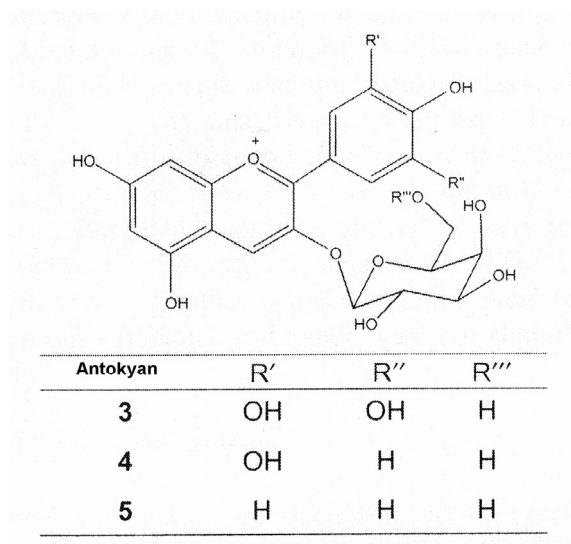
Ze základních složek bílkovin – aminokyselin je 8 pro člověka nepostradatelných (tzv. esenciální aminokyseliny – isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan, valin). V ovoci a zelenině je jich jednotlivě méně než 1 g.kg⁻¹. [2]

1.2.5 Přírodní barviva - anthokyany

Jsou to barviva rozpustná ve vodě a dodávají rostlinným pletivům červené, červenofialové až modrofialové zbarvení v závislosti na pH. Chemicky jde o heteroglykosidy a jejich aglykony. Jejich množství závisí na rostlinném druhu. Např. v třešních jich bývá nad 400 mg.kg⁻¹. Nejčastěji se ovoci vyskytuje kyanidin, pelargonidin, oenidin, chrysantamin, peonidin, fragarin, cerakyan, myrtilin, delphinidin. [2]

V současných studiích byl zkoumán vodný extrakt dřínu obecného z důvodu jeho antioxidačních vlastností. Antioxidační vlastnosti tohoto vodného extraktu byly hodnoceny prostřednictvím různých antioxidačních testů, které zahrnovaly např.: stanovení redukční síly, schopnost odstraňovat volné radikály a další. Tyto antioxidační vlastnosti extraktů dřínu mohou být využity k inhibici oxidace lipidů.

Dřín obecný je dobře známý v turecké lidové medicíně a je užíván kvůli jeho antimikrobiálním vlastnostem. Dále bylo zaznamenáno, že dřín obecný má protizánětlivý a protizácpový efekt. Z anthokyanů, kterých ovoce obsahuje významné množství, byly izolovány delphinidin 3-O-β-galactosid (3), cyanidin 3-O-β-galactosid (4) a pelargonidin 3-O-β-galactosid (5) viz následující obrázek č. 5. Je známo, že anthokyany mají antioxidační a protizánětlivý vliv. Proto konzumace stravy, která obsahuje anthokyany jako součást výživy, může být prospěšná pro lidské zdraví. [2]



Obr. č. 5: Anthokyany obsažené v dřínu obecném [2]

1.2.6 Minerální látky v dříncích

Uvádějí se souborným parametrem jako popeloviny, stanovené spálením a vyžiháním ve formě oxidů s solí. Tento údaj je zkreslen ztrátou některých těkavých minerálních látek. Jednotlivé položky jsou pak uvedeny obsahem čistých prvků.

Podle významu jsou prvky rozdělovány na nezbytné (esenciální), prospěšné (biogenní) a toxické (anabiogenní). Podle množství, potřebného ve výživě se biogenní prvky označují jako makrobiogenní (doporučená potřeba řádově ve stovkách mg – Na, K, Ca, Mg, P, Cl, S), oligobiogenní (potřeba v miligramech – Fe, Cu, Zn, Mn, Si, Li) a mikrobiogenní čili stopové (potřeba ve zlomcích mg – Co, Mo, I, F, Se, Ni, Cr, V). U dalších prvků nebyla jednoznačně prokázána nezbytnost nebo prospěšnost (Al, Ag, Au, B, Sr, Ti). [12]

Minerální látky jsou potřebné pro lidský organismus jako stavební složky (Ca, P) nebo jako součást enzymových systémů (Fe, K). Lidské tělo obsahuje přibližně 4 % minerálních prvků, z toho je převážná část (83 %) přítomná v kostech. V organismu se udržuje acidobazická rovnováha, ovoce a zelenina dodává převahu alkaligenních prvků, které jsou v ostatní potravě nedostatkové. Důležitý je vzájemný poměr prvků, např. Ca:P (1:1), Ca:Mg (1:1 až 1:2), K:Ca+Mg (1:1,8) aj. minerální složky jsou přítomny v ovoci a zelenině jako přijatelné anorganické a organické sloučeniny v příznivých hmotnostních poměrech. [2]

Tab. č. 6: Obsah minerálních látek [2]

Minerální látky v dříncích [mg.kg ⁻¹]				
Ca	Fe	Mg	P	K
460,0	32,8	200,0	250,0	2900,0

Vápník (Ca)

- hlavní stavební složkou kostních a zubních tkání společně s kyselinou fosforečnou a hořčíkem
- snižuje riziko osteoporózy, ovlivňuje pružnost buněčných stěn a srážení krve
- působí na nervovou a svalovou činnost (společně s draslíkem)
- snižuje krevní tlak, preventivně chrání před ischemickou chorobou srdeční [2]

Železo (Fe)

- nepostradatelné pro tvorbu hemoglobinu a okysličovacích enzymů
- často nedostatkovým prvkem v naší potravě
- využitelnost železa z potravy závisí na formě, v níž se železo nachází, a na složení potravy
- železo ovoce a zeleniny je v důsledku působení přítomného vitamínu C v těle využíváno z 80 %, zatím co železo z masa, vajec a chleba pouze z 20 až 40 %, pokud se konzumuje např. maso současně se zeleninou, využitelnost železa se zvyšuje [2]

Hořčík (Mg)

- má doplňkovou funkci při stavbě kostí a tvorbě enzymů
- nedostatek zpomaluje růst, způsobuje podrážděnost, vypadávání vlasů a poruchy kůže [2]

Fosfor (P)

- v těle je přítomen jako součást kostí a enzymů
- zabezpečuje přenos energie [2]

Draslík (K)

- udržuje v těle stálý osmotický tlak
- působí při vylučování vody (diuretický účinek)
- posiluje krevní oběh a činnost svalů [2]



Obr. č. 6: Plody dřínu obecného [10]

1.3 Využití plodů

Plody mnohých druhů méně známého ovoce můžeme konzumovat v syrovém stavu, ale jiných druhů až po kuchyňské úpravě. Pokud je však chceme co nejlépe zužítkovat, pak máme možnost zpracovat je konzervářskými způsoby na kompoty, mošty, sirupy, marmelády, rosoly, povidla a džemy anebo je usušit. Jsou to nejvhodnější způsoby, jakými můžeme uchovat přirozené nutriční a smyslové hodnoty méně známého ovoce na pozdější dobu. Červené nakyslé peckovičky dřínu si zachovávají v konzervářských výrobcích podstatnou část svého vyššího obsahu vitamínu C, karotenoidů a vitamínů skupinu B. Cukry, kyseliny, třísloviny a jiné látky obsažené v džínkách dodávají výrobkům příjemnou a lahodnou chuť.

V oblastech Kavkazu se džínky požívají k výrobě likéru zvaného „dernovka“, někdy se z plodů vyrábí tvrdý destilát osobité chutě. Z plodů se ale také místně připravuje chutný sirup příznačný vysokým obsahem vitamínů. [2]



Obr. č. 7: Zavařené džínky [11]



Obr. č. 8: Džem z dřínu obecného [12]

1.4 Jeřáb – *Sorbus* L.

Jeřáb je druhem, který již dávno v Evropě zdomácněl. Vyskytuje se roztroušeně na celé severní polokouli asi v osmdesáti druzích, které byly postupně modifikovány místními podmínkami. Mezi nejrozšířenější druhy patří zejména jeřáb obecný – *Sorbus aucuparia* L., dále pak muk obecný – *Sorbus aria* (L.) GRANTZ., oskeruše – *Sorbus domestica* L., břek – *Sorbus torminalis* (L.) GRANTZ a jiné.



Obr. č. 9: Jeřáb obecný (*Sorbus aucuparia*) [13]

1.4.1 Popis rostliny

Jeřáb obecný – *Sorbus aucuparia* L.

Jeřáb oprávněně pokládáme za ovocnou dřevinu, a pokud jej i takto zařazujeme, konstatujeme, že je současně posledním reprezentantem a tedy i zástupcem ovocných druhů v nejvyšších polohách, kde už jiné ovocné dřeviny nenalézají ani minimální stanovištní podmínky pro příhodné pěstování s odpovídajícími výsledky. Jeřábům se tedy ještě dobře daří ve vlhkých horských polohách, v nížinách přirozené rozšíření nenalezl. Ve Skandinávii se s úspěchem pěstuje až do výšky 1500 m a v rakouských Alpách dokonce do výšky 2400 m. n. m.

Původní jeřáb obecný roste ve stromovitém tvaru, v horších podmínkách s nižším kmenem nebo dokonce i ve tvaru keřovitém, pokud je vícekmenný. V dobrých podmínkách a pěstitelsky vedeném tvaru dosahuje výšky koruny 8–12 m. Pokud jsou stromy nepoškozené, dožívají se stáří i 80 let. Koruny stromů jsou zpočátku úzce pyramidální, později se rozkládají. Listy jsou lichozpeřené až devítijařmé, lístky jsou podlouhlé vejčité, kopinaté a buď celokrajné, nebo částečně ostře pilovité. Lístky jsou na spodní straně plstnaté.

Květy jsou bílé barvy a jsou ve větším počtu uloženy v chocholičnatých latách. Při rozkvetu velmi intenzívně voní. Plody jsou červené, někdy i nažloutlé malvice. Velikost plodů, ale hlavně jejich barva, jsou rozlišovacími znaky jednotlivých variet. Pokud jde o chuť plodů v syrovém stavu, je možno konstatovat, že na přímý konzum není vhodná žádná varieta, i když jsou mezi nimi jisté chuťové rozdíly.

1.4.2 Chemické složení a využití

Léčivé účinky využívané především v prevenci jsou zvláště průkazné zásluhou vitamínu C. Již dříve byly tyto plody používány proti skorbutu. Dalších součástí celého aktivního komplexu látek se využívalo jako projímadlo, kde se projevovala především kyselina parasorbinová. Oproti tomu jako statikum ve formě vařených plodů působily zase třísloviny. Těchto účinků se využívalo i ve veterinární lidové praxi. Extrakty z plodů se využívaly i při léčení a prevenci onemocnění dýchacích orgánů. Zvláště šťávy a sirupy mají léčivý účinek na horní cesty dýchací. Různé čaje z plodů upravují zažívací funkce.

Velmi cennou látkou v plodech je sorbit, který se z plodů získává dokonce průmyslově. Jeho velkou předností jako sladidla je vhodnost použití v dietetickém jídelníčku diabetiků, kde v lehčích případech této choroby nezatěžuje tak nepříznivě funkci metabolismu sacharidů jako ostatní běžně používané cukry. Vhodně se aplikuje do dietetických výrobků. Sorbit je rovněž základní látkou pro získávání kyseliny askorbové, která je vlastně z celé skupiny uvedených látek pro organismus člověka nejcennější.

Plody jeřábu vynikají vysokým obsahem vitamínu C. Vyskytuje se zde v množství až 600 mg na 1 kg plodů. Je také stabilní v sušených a konzervovaných plodech. Dále je v plodech jeřábu provitamin A, kterého obsahuje více než např. mrkev. Významný je rovněž obsah kyselin a cukrů. Velmi cenný je obsah flavonoidů. Vedle kyseliny jablečné je zde přítomna kyselina jantarová a kyselina citronová. [14]

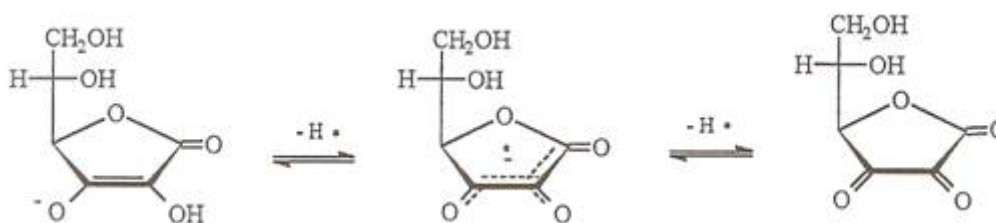


Obr. č. 10: Vodka s extraktem z jeřabin [15]

1.5 Vitamin C

Historie

Struktura vitaminu C, zkonstruovaná jako hexuronová kyselina, byla prokázána v roce 1933 na Univerzitě v Birminghamu v Anglii Walterem Haworthem a je spojován i s její syntézou. Szent-Györgyi a Haworth přejmenovali hexuronovou kyselinu na L-askorbovou kyselinu, podle jejich antiskorbutických vlastností. Jméno bylo oficiálně přijato v roce 1965. Szent-Györgyi i Haworth byli oba oceněni Nobelovou cenou v roce 1937, první za fyziologii a medicínu a druhý za chemii. Synteticky připravená askorbová kyselina ukazuje, že má identické fyziochemické a biologické vlastnosti jako vitamin C izolovaný z rostlin nebo z tkání zvířat a mezi syntetickým a přírodním produktem nejsou žádné rozdílnosti v biologickém účinku. V roce 1934 Reichstein a Grüssner ve Švýcarsku vypracovali chemickou dráhu pro komerční syntézu z glukózy. [16]



Obr. č. 11: Oxidace kyseliny askorbové [17]

Pojmem vitamin C se označuje redukčně-oxidační systém kyseliny askorbové a dehydroaskorbové. Kromě volné formy mohou být složky vitaminu C vázány např. v askorbigéně.

Tento vitamin je určitě nejznámější a patří k nejrozšířenějším. Představuje 80 % veškeré potřeby vitaminů. Tento vitamin tvoří především kyselina L-askorbová, kterou organismus potřebuje pravidelně dodávat, protože ji nedokáže sám syntetizovat. Vitamin C je rozpustný ve vodě. Hlavním metabolitem je kyselina oxalová, která se vylučuje močí. Mechanismus účinku kyseliny askorbové souvisí s jeho redukčními vlastnostmi. Kyselina askorbová je jako kofaktor řady hydroxylačních a amidačních reakcí při nichž se uvolňuje redukční radikál H^+ . [18, 19]

Lidé a další primáti, morčata, někteří netopýři, exotičtí ptáci a ryby jako losos, pstruh duhový a kapr postrádají enzym L-gulono- γ -lakton oxidázu, která katalyzuje konečný krok biosyntézy askorbové kyseliny, a proto jsou závislí na stravě poskytující vitamin C. Jiné druhy zvířat mohou syntetizovat askorbovou kyselinu z glukózy a nepotřebují potravu s vitaminem C. [16]

1.5.1 Dehydroaskorbová kyselina

Kyselina dehydroaskorbová (DHA) je reversibilně oxidována z kyseliny askorbové (AA). Obě varianty, jak DHA tak AA jsou důležité sloučeniny v různých složkách potravy. Ačkoli DHA i AA mají antiskorbutické vlastnosti, když jsou podávány orálně, DHA má několik vlastností, které ji liší od AA. DHA je více reaktivní a nestabilní v roztocích než AA. Mimoto, DHA může být redukována na AA nebo snadno hydrolyzována a oxidována, vytváří oxidační a redukční činidlo. V buněčném systému má čistá DHA jiné biologické role než AA.

Vztah askorbové kyseliny k dehydroaskorbové kyselině

Oxidace AA na DHA poskytuje dva vodíkové atomy, které mohou být použity na redukcí biologicky významných sloučenin. Do té doby, než dojde k oxidaci AA, může být použita ke stanovení AA využitím elektrochemického detekčního systému vytvořením signálu z proudu nebo změny napětí. Reakce, ve které je AA převedena na DHA, je dvoukrokový proces, který vytváří volné radikály, takže konverze AA na DHA může potenciálně podporovat obojí, redukcí a paradoxně i oxidaci v systému.

K redukcí DHA různými činidly dochází snadno a vede ke zvýšení množství AA. Analýza AA před a po redukcí je běžná metoda nepřímého stanovení DHA ve vzorku. Díky těmto blízkým vztahům DHA a AA, pojednání o jakékoli vlastnosti nebo analýza DHA bude často odkazovat zpět na vlastnosti AA ve stejném systému.

Metody oxidace askorbové kyseliny na dehydroaskorbovou kyselinu

DHA může být připravena z AA během různých oxidačních reakcí využívající např. halogeny, peroxid vodíku nebo chlorid železitý. Obvyklou metodou je použití bromové vody. Někdy je uplatňována askorbát oxidáza. Každý způsob má různé výhody i nevýhody, ale využití bromové vody je preferováno kvůli jednoduchosti.

Metody redukce dehydroaskorbové kyseliny na askorbovou kyselinu

Thiol-obsahující sloučeniny snadno převádí DHA na AA, např. různé sulphydrylové sloučeniny zahrnující dimerkaptopropanol, merkapt ethanol, homocystein, glutathion a dithiothreitol..

Antioxidační vlastnosti dehydroaskorbové kyseliny

Ačkoli je ve dvojici AA:DHA AA mnohem lépe redukována i u DHA samotné se objevují antioxidační vlastnosti. To je vidět například, že DHA je lepší než AA v ochraně nízkohustotních lipoproteinů (LDL) před oxidací měďnatými ionty. [20]

1.5.2 Použití askorbové kyseliny v potravinářství

Askorbová kyselina má díky svým vlastnostem (vitamin, antioxidant a chelatační činidlo) široké použití jako potravinářské aditivum především v konzervárenství a kvasné technologii a v technologii masa, tuků a v cereální technologii. Jako antioxidant se používá také ve vodě rozpustná sůl askorbové kyseliny, natrium-askorbát (v praxi nazývaný askorbát sodný) a lipofilní 6-palmitoyl-L-askorbová kyselina (L-askorbyl-6-palmitát), která současně inhibuje tvorbu nitrosaminů v nakládaném masu a v masných výrobcích.

Askorbová kyselina se přidává k ovocným džusům, konzervovanému a mrazírensky skladovanému ovoci jako prevence nežádoucích změn aroma vyvolaných oxidací při skladování a zpracování. K odstranění kyslíku v hermeticky uzavřených obalech je nutný

přídavek 3–7 mg askorbové kyseliny (podle pH a teploty) na 1 cm³ přítomného vzduchu. Při loupání, krájení a sušení ovoce, zeleniny a brambor se používá jako inhibitor reakcí enzymového hnědnutí v relativně nízkých koncentracích a často v kombinaci s citrónovou kyselinou.

Přídavek askorbové kyseliny v množství 20 až 30 mg.kg⁻¹ je prevencí tvorby tzv. chladových a oxidačních zákalů piva a prevencí nežádoucích změn chuti a aroma v důsledku oxidace, ke které dochází při pasteraci a skladování. Použití askorbové kyseliny při výrobě vína umožňuje snížit množství použitého oxidu siřičitého k síření.

Přídavek askorbové kyseliny (resp. natrium-askorbátu nebo askorbyl-palmitátu) k masu a masným výrobkům s dusitany (v množství 60 až 180 mg.kg⁻¹), např. při výrobě šunky, má funkční i ekonomický význam, neboť zkvalitňuje a podstatně zrychluje výrobu. Charakteristický pigment syrového masa ošetřeného dusitany, nitroxymyoglobin, se tvoří přibližně třikrát rychleji. Přídavek askorbové kyseliny navíc umožňuje zkrátit dobu uzení a stabilizuje barvu hotových výrobků. Askorbová kyselina současně zvyšuje inhibiční účinky dusitanů na toxigenní bakterie *Clostridium botulinum*. Přídavky v množství 300–1000 mg.kg⁻¹ (jako optimální se uvádí poměr askorbátu a dusitanu 2:1, hydrofilní askorbát je však jen částečně účinný, proto se často nahrzuje askorbyl-palmitátem rozpustným v tucích) inhibují i tvorbu nitrosaminů. Použijí-li se k nakládání masa dusičnany, askorbová kyselina je redukuje na dusitany.

V množství 10–100 mg.kg⁻¹ se askorbová kyselina přidává jako prostředek zlepšující pekařské vlastnosti mouky.

Jako antioxidant tuků se používá askorbyl-palmitát v množství 0,006–0,040 %. [21]

1.5.3 Zdroje vitamínu C

Potraviny rostlinného původu

Nejbohatším zdrojem vitamínu C je ovoce a zelenina. Nejvyšší obsah vitamínu má čerstvé ovoce a čerstvá zelenina. Mezi jednotlivými druhy však existují velké rozdíly v obsahu vitamínu. Ten je výrazně závislý i na vegetačních podmínkách během růstu, stupni zralosti, způsobu posklizňového zpracování a mnoha dalších faktorech.

Absolutně nejvyšší koncentrace askorbové kyseliny, dosahující 17–46 g.kg⁻¹ jedlého podílu, obsahuje ovoce acerola (*Malpighia marginata*, syn. *M. puniceifolia*) ze Západoindických ostrovů, 23–32 g.kg⁻¹ jedlého podílu je v plodech australského stromu *Terminalia ferdinandiana*. Bohaté zdroje vitamínu C však zpravidla nebývají příliš významné pro krytí potřeby vitamínu (např. šípky, černý rybíz, kadeřavá petržel), neboť se konzumují jen příležitostně a v malém množství.

Mnohem větší význam mají zdroje s průměrným obsahem vitamínu (především brambory, i když obsah vitamínu během uskladnění po dobu zimních měsíců velmi klesá), které se konzumují pravidelně a v relativně značném množství. Cereálie obsahují stopy vitamínu, poněkud vyšší obsah je pouze v klíčících semenech. [2]

Tab. č. 7: Obsah vitamínu C v některých potravinách [2]

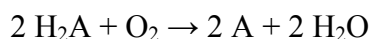
Potravina	mg.kg ⁻¹ v jedlém podílu	Potravina	mg.kg ⁻¹ v jedlém podílu
maso	10–20	mrkev	50–100
šunka	300–500	petržel kořenová	230
vnitřnosti	50–340	petržel kadeřavá	1500–2700
mléko	5–20	pažitka	430
jablka	15–50	pór	150–300
hrušky	20–40	cibule	90–100
švestky	25–45	česnek	150–160
broskve	70–100	křen	450–1200
višně, třesné	60–300	zeli	170–700
angrešt	330–480	kapusta hlávková	700–1400
rybíz červený	200–500	kapusta růžičková	1000–1030
rybíz černý	1100–3000	brokolice	1100–1130
hroznové víno	20–50	květák	47–1610
jahody	400–700	kedluben	280–700
borůvky	90	salát hlávkový	60–300
melouny	130–590	špenát	350–840
pomeranče	300–600	rajčata	80–380
citrony	300–640	lilek	80
grapefruity	240–700	paprika (různé druhy)	620–3000
ananas	150–250	okurka	65–110
banány	90–320	chřest	150–400
kiwi	700–1270	hrášek	80–410
mango	100–350	fazolové lusky	90–300
papája	620–980	řepa salátová	65
šípky	2500–10000	brambory	80–400

1.5.4 Reakce

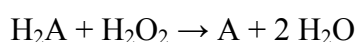
Enzymová oxidace

V enzymově aktivních a zvláště v mechanicky poškozených rostlinných pletivech (loupáním, krájením, apod.) je oxidace katalyzována hlavně askorbát oxidasou (L-askorbát:O₂ oxidoreduktasou). V některých rostlinných pletivech souvisí ztráty vitamínu s aktivitou peroxidas a jiných enzymů.

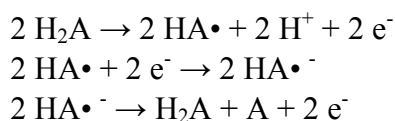
Asorbát oxidasa oxiduje askorbovou kyselinu v přítomnosti vzdušného kyslíku. Obecně lze reakci popsat následující rovnicí, kde H₂A je askorbová kyselina a A je dehydroaskorbová kyselina:



Askorbátperoxidasa využívá jako akceptor protonů peroxid vodíku:



Detailní mechanismy reakcí jsou ve skutečnosti složitější. V obou případech je primárním produktem oxidace askorbové kyseliny askorbylradikál (HA•), resp. Jeho anion (HA•⁻) stabilizovaný rezonancí. Je relativně inertní a nereaguje s kyslíkem, ale poměrně rychle (poločas reakce je asi 0,2 s) poskytuje disproporcionací ekvimolární směs askorbové a dehydroaskorbové kyseliny (resp. bicyckického hydrátu dehydroaskorbové kyseliny):

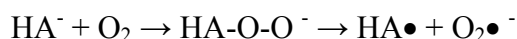


Reakce se opakuje tak dlouho, dokud není veškerá askorbová kyselina zoxidována. Reakce je vratná a dehydroaskorbová kyselina může být redukována zpět na askorbovou kyselinu (např. glutathionem, cysteinem a jinými thioley, hydrochinony a dalšími látkami). Ztráty vitamínu enzymovou oxidací v ovoci a zelenině při zpracování lze omezit účinným blanšírováním, které inaktivuje enzymy oxidující askorbovou kyselinu.

Autooxidace

Nejvýznamnější reakcí askorbové kyseliny je oxidace vzdušným kyslíkem (autooxidace), která způsobuje většinu ztrát kyseliny askorbové v potravinách při jejich zpracování. Probíhá v přítomnosti i v nepřítomnosti iontů přechodných kovů. Aktivní jsou hlavně ionty trojmocného železa a dvojmocné mědi. Reakce závisí na hodnotě pH prostředí. V kyselém prostředí je pomalá, rychlejší je v neutrálním a nejrychlejší v alkalickém prostředí.

Autooxidace probíhá následujícím mechanismem:

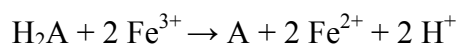


Reakcí aniontu askorbové kyseliny s tripletovým kyslíkem vzniká hydroperoxid aniontu askorbové kyseliny (HA-O-O⁻), který se rozkládá na askorbylradikál (HA•) a superoxidový radikál (O₂•⁻).

Redukce iontů kovů

Askorbová kyselina reaguje s ionty kovů za vzniku komplexů, ale za určitých podmínek (především při nízkých hodnotách pH prostředí a je-li přítomna v nízkých koncentracích) může ionty kovů také redukovat.

Reakce například s ionty Fe^{3+} probíhá podle následujícího schématu:

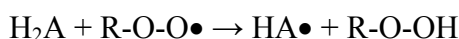


Redukční působení askorbové kyseliny v konečném efektu urychluje oxidační reakce související s nežádoucími změnami chuti, vůně a barvy potravin.

Reakce s volnými radikály

Askorbová kyselina i její isomery a deriváty mohou reagovat s volnými radikály, které způsobují oxidaci lipidů a dalších oxylabilních složek potravin. Brzdí tak řetězovou autooxidační reakci a účinně působí jako antioxidanty.

Reakci askorbové kyseliny s peroxylovým radikálem mastné kyseliny ($\text{R-O-O}\bullet$) lze schematicky znázornit následující rovnicí. (R-O-OH je hydroperoxid mastné kyseliny).



Degradace katalyzovaná kyselinami

V silně kyselém prostředí askorbová kyselina dekarboxyluje a stejně jako jiné cukry dehydratuje. V modelových pokusech vzniká téměř kvantitativně oxid uhličitý a 2-furan-karbaldehyd. Kysele katalyzovaná degradace askorbové kyseliny se považuje za hlavní příčinu ztrát vitamínu C v konzervářských výrobcích v nepřítomnosti vzdušného kyslíku. Dochází k ní v kyselých potravinách jako jsou ovocné kompoty a džusy (pH kolem hodnoty 3,5), zvláště při skladování za vyšších teplot nebo při termických operacích jako je sušení. Při teplotě 50°C ztrácejí ovocné džusy 70–95 % askorbové kyseliny během 12 týdnů skladování. Rychlost reakce je asi desetkrát nižší než je rychlost autooxidace katalyzované kovovými ionty.

Reakce s dalšími složkami potravin

Ke ztrátám vitamínu C může docházet také reakcí askorbové kyseliny s některými reaktivními složkami potravin. Technologicky významné jsou zejména reakce s chinony vznikajícími reakcemi enzymového hnědnutí, reakce s dusitany a hemovými barvivy v mase a masných výrobcích [13].

1.5.5 Změny

Askorbová kyselina je jedním z nejméně stálých vitaminů. Ke ztrátám při skladování, kulinárním a průmyslovém zpracování potravin dochází různými způsoby. Nejvýznamnější jsou ztráty výluhem a ztráty oxidací. V nepřítomnosti vzdušného kyslíku jsou ztráty způsobeny hlavně kyselinami katalyzovanou degradací. Celkové ztráty se pohybují zpravidla mezi 20 až 80 %.[2]

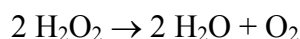
Ovoce a zelenina

Ztráty askorbové kyseliny výluhem jsou obvyklé při mytí, blanširování (předváření), vaření a konzervování ovoce a zeleniny v případech, kdy se příslušný výluh dále nezpracovává. Povaha a rozsah ztrát závisí na pH, teplotě, množství vody, velikosti povrchu materiálu, zralosti, rozsahu kontaminace těžkými kovy a přívodu kyslíku. Ztráty výluhem jsou vyšší u listové zeleniny s velkým povrchem než u kořenové zeleniny. Ke značnému úbytku dochází rovněž loupáním plodů, kdy se odstraňují povrchové vrstvy bohaté na vitamin.

Při mytí jsou ztráty nižší než při blanširování a vaření. Ke ztrátám vitaminu dochází také při mléčném kvašení zeleniny. Kysané zelí např. obsahuje asi 50 % vitaminu ve srovnání s čerstvým hlávkovým zelím (90–190 mg.kg⁻¹).

Snahou konzervářů je pochopitelně uchování maximálního množství vitaminu v ovoci a zelenině během skladování a v příslušných výrobcích po jejich zpracování. Používané metody a postupy jsou založeny na:

- omezení kontaktu potravin se vzduchem, snížení množství přítomného kyslíku např. odvodu vzduchu za sníženého tlaku, výměnou vzduchu za inertní atmosféru, působením glukosaoxidas a katalas kvašením a přidavkem hydrogensířičitanů; glukosaoxida (β-D-glukosa:O₂ oxidoreduktasa) katalyzuje oxidaci D-glukosy na D-glukonovou kyselinu a peroxid vodíku, který je potom redukován katalasou (oxido-reduktasa) na vodu:



- snížení množství přítomných iontů Fe³⁺ a Cu²⁺ např. vyloučením přímého kontaktu s měděnými, bronzovými, mosaznými a korodujícími železnými součástmi technologického zařízení, vazbou iontů kovů do neaktivních komplexů chelatačními činidly (autooxidaci zpomaluje řada látek jako je EDTA, tj. ethylendiamintetraoctová kyselina neboli komplexon II, citráty, fosfáty a také bílkoviny, sacharidy, kyselé polysacharidy a flavonoidy)
- vytváření nepříznivých podmínek pro vznik komplexů kovových iontů s askorbovou kyselinou, např. snížením aktivity vody, hodnoty pH, použitím vhodných O-2 substituovaných derivátů askorbové kyseliny, jako je např. 2-fosfát nebo 2-O-α-D-glukosid.

Během zpracování je stabilita askorbové kyseliny vyšší u ovoce, které má nižší pH než zelenina. Nejmenší ztráty se dosahují aplikací vysokoteplotní krátkodobé sterilace. U kompotů dochází k největším ztrátám během jejich skladování. Výše těchto ztrát je závislá na době a teplotě skladování a pohybuje se v rozmezí 10–50 %. Průměrná retence u obohacených ovocných šťáv se pohybuje v rozmezí 60–80 %.

U ovoce ošetřeného (konzervovaného) oxidem siřičitým jsou ztráty askorbové kyseliny během technologického zpracování nižší, neboť přítomný oxid siřičitý redukuje peroxid vodíku vznikající oxidací askorbové kyseliny v přítomnosti těžkých kovů. Nejstabilnější je vitamin C při zmrazování a mrazírenském skladování ovoce a zeleniny. Při teplotách -18 °C dochází jen k minimálním ztrátám, naopak ke značným ztrátám může docházet při rozmrazování (30–50 %). [2]

Spektrální vlastnosti vitamínu C

Absorpční vlastnosti jsou závislé na přítomnosti iontových látek, a proto závisí na pH vodného prostředí. Při pH větším než 5 se L-askorbová kyselina vyskytuje převážně jako monoanion a má maximální absorpci při 265 nm. Nedisociovaná, při více kyselém pH, maximální absorpce dosahuje při 244–245 nm. Plně disociovaná, nad pH 12, dosahuje maximální absorpce při 300 nm. L-askorbová kyselina nefluoreskuje, ačkoli derivatizací s O-phenylendiaminem vytváří vysoce fluorescenční produkt.

Stabilita

Krystalická L-askorbová kyselina je vysoce stabilní v přítomnosti kyslíku, pokud je aktivita vody nízká. V roztoku mohou vést silné redukční vlastnosti vitamínu k rychlým a nepřiměřeným oxidačním změnám při konverzi na dehydroaskorbovou kyselinu. Ireverzibilní hydrolýza L-dehydroaskorbové kyseliny produkuje biologicky inaktivní 2,3-diketo-L-gulonovou kyselinu. V biologických systémech mohou redukující činidla převést dehydro formu zpět na L-askorbovou kyselinu. Enzymatická konverze L-dehydroaskorbátu na L-askorbovou kyselinu glutathiondehydrogenázou je důležitou biologickou obranou proti oxidačnímu stresu. Kyslík, teplota, světlo, kovové katalyzátory, pH a možná přítomnost oxidázy askorbové kyseliny v biologickém systému vzájemně interagují a produkují komplexní sloučeniny, které ovlivňují oxidační stabilitu. Kovové katalyzátory mohou zvýšit degradační rychlost ve srovnání s nekatalyzovanou oxidací.

V potravinách velmi ovlivňuje oxidační stabilitu pH. Maximální stabilita se vyskytuje mezi pH 4 až 6. Ztráty při vaření závisí na stupni teploty, dochází k vyluhování do prostředí, kde je jídlo připravováno, záleží na tom, jak je plocha pro přípravu vystavena vodě nebo kyslíku, pH a také má vliv přítomnost přechodných kovů. L-askorbová kyselina je charakteristický redukton a vstupuje do neenzymatických Maillardových reakcí. Hnědnutí v potravinách může významně snižovat obsah vitamínu C.

Extrakce

Extrakční procesy jsou navrženy tak, aby stabilizovaly vitamin C, právě kvůli jeho přirozené nestabilitě. Extrakční roztoky by měly mít tyto vlastnosti: kyselé pH, inaktivovanou oxidázu askorbové kyseliny, omezenou rozpustnost kyslíku, vyloučení škrobu a proteinů. Výběr extrakčního roztoku je závislý na samotném vzorku a na způsobu stanovení. Následující a nejčastěji používané extrakční roztoky jsou tyto: 3% až 6% roztok kyseliny metafosforečné obsahující kyselinu octovou nebo sírovou a 0,005 M kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA). V těchto extrakčních roztocích dochází k rozpadu vitamínu C nejvýše do 5 %. Metafosforečná kyselina inhibuje oxidázu L-askorbové kyseliny, inhibuje katalýzu kovů, sráží proteiny, což pomáhá k vyčištění extraktu. Škrob je problematický v tom, že narušuje kolorimetrickou titraci a fluorimetrické stanovení. Přídavek ethanolu nebo acetonu do extrakčního roztoku kyseliny metafosforečné sráží případný vyextrahovaný škrob. Toho se využívá při analýzách ovoce, brambor, luštěnin a kukuřice spektroskopickými metodami. Aceton je také užitečný k odstranění disiřičitanu a oxidu siřičitého ze sušených ovocných výrobků a ovocných džusů.

Veškeré extrakční postupy by měly být hotovy rychle při tlumeném světle, aby byly omezeny oxidační reakce katalyzované světlem. Je také možno vzorek pod dusíkem. Vitamin lze efektivně stabilizovat i přídavkem dithiothreitolu nebo thiosulfátu sodného. [22]

1.5.6 Vliv vitamínu C na organismus člověka

Vitamin C se podílí především na významných hydroxylačních reakcích probíhajících v organismu. Dále se účastní biosyntézy mukopolysacharidů, prostaglandinů, adsorpce iontových forem železa, jeho transport, stimuluje transport sodných, chloridových iontů a zřejmě i vápenatých iontů, uplatňuje se v metabolismu cholesterolu, drog a v řadě dalších reakcích.

Velmi důležitými reakcemi souvisejícími s antioxidačními vlastnostmi vitamínu jsou reakce s aktivními formami kyslíku, resp. s volnými radikály, a reakce s oxidovanými formami vitamínu E, které zabezpečují ochranu vitamínu E a lipidů membrán před oxidací. Ochrannou funkci má i pro labilní formy listové kyseliny. Inhibuje také tvorbu nitrosaminů a působí tak jako modulátor mutogeneze a karcinogeneze. Mnoho dalších aktivit vitamínu C je dosud známo jen částečně.[2]

Obranyschopnost organismu

- vitamin C je posilující prostředek, který má schopnost zvyšovat obranyschopnost proti infekčním nemocem a nachlazení
- bílé krvinky, které hrají důležitou roli v boji proti chorobám, jsou aktivovány vitaminem C a potřebují mít k dispozici jeho bohatou zásobu

Nachlazení

- při infekcích stoupá potřeba vitamínu C dvacetkrát až čtyřicetkrát, při epidemiích nachlazení a chřipky je preventivní dávkou vitamínu C až 200 mg, ale pouze po dobu ohrožení

Cholesterol

- vitamin C se podílí na odbourávání cholesterolu v játrech a zrychluje jeho přeměnu na žlučové kyseliny, důležitou roli hraje i dostatečný přísun dalších látek zejména vitamínu E a kyseliny nikotinové

Srdce

- vitamin C zajišťuje ochranu před srdečními chorobami
- a jeho nedostatek má vliv na vznik srdečního infarktu a mrtvice, vyvolaných krevními sraženinami, neboť snížená hladina tohoto vitamínu zvyšuje riziko tvorby krevní sraženin
- zpevňuje a udržuje pružné stěny cév od žil až po kapiláry

Další vliv vitamínu C

- rakovina
- hojení ran včetně operačních, zlomenin a popálenin
- alergie
- zrak
- dlouhověkost
- detoxikace organismu
- paměť
- krása

Vstřebávání narušuje

- je citlivý na kyslík, kovy a světlo
- ničí ho tepelná úprava, hluboké zmrazování, konzervování a okysličování a dále některé léky – sirupy na kašel, acylpyrin, antibiotika, barbituráty, antikoncepční tablety

Usnadňování vstřebávání

- bioflavonoidy a minerály vápník a hořčík
- naopak vitamin C usnadňuje vstřebávání železa [2]

1.5.7 Doporučená denní dávka

Denní dávka 10 mg L-askorbové kyseliny bývá postačující k prevenci skorbutu. Dříve se doporučoval denní příjem 30 mg vitaminu, u adolescentů 50 mg, u těhotných žen 60 mg. Dnes se doporučovaný denní příjem pohybuje v rozmezí 60–200 mg. U pacientů s respiračními chorobami, při rekonvalescenci a v dalších případech se podávají denní dávky v množství 1000 mg i více.

Veškerá potřeba vitaminu C je kryta vitaminem z potravy, hlavně bramborami (asi 20–30 %), zeleninou (asi 30–40 %) a ovocem (30–35 %). Mléko se na krytí potřeby podílí z necelých 10 %. Deficience vitaminu C či hypovitaminosa se projevuje řadou nespecifických příznaků, nejčastěji tzv. jarní únavou. Nejznámějším syndromem akutní avitaminosy jsou kurděje (skorbut). Podle některých nových výzkumů má dehydroaskorbová kyselina nižší aktivitu než askorbová kyselina. [21]

Tab. č. 8: Doporučená denní dávka vitaminu C podle USA – (DRI) dietary reference intakes [20]

Věk	DRI (mg.d ⁻¹)	Věk	DRI (mg.d ⁻¹)
Kojenci		Ženy	
0–6 měsíců	40	9–13 let	45
7–12 měsíců	50	14–18 let	65
Děti		19–30 let	75
1–3 roky	15	31–50 let	75
4–8 let	25	51–70 let	75
Muži		>70	75
9–13 let	45	V těhotenství	
14–18 let	75	≤18 let	80
19–30 let	90	19–30 let	85
31–50 let	90	31–50 let	85
51–70 let	90	Při kojení	
>70	90	≤18 let	115
		19–30 let	120
		31–50 let	120

1.6 Popis metody stanovení vitamínu C pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují – separují – složky obsažené ve vzorku. Svým určením je to především metoda kvalitativní a kvantitativní analýzy vzorku.

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní (až 85 % všech sloučenin).

Mobilní fáze

K separaci využívá různé systémy pevné nebo kapalně stacionární fáze a kapalně mobilní fáze. Narozdíl od plynové chromatografie hraje mobilní fáze v případě kapalinové chromatografie aktivní roli. Podle mechanismu separace se používají rozpouštědla, resp. rozpouštědlové směsi různé polarity, přičemž změna vlastností mobilní fáze je v systému s danou stacionární fází hlavním faktorem ovlivňujícím retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení.

Vliv teploty se neuplatňuje tak významně jako u plynové chromatografie, i když u složitých směsí látek umožňuje změna teploty separačního systému dosáhnout lepšího rozlišení zón jednotlivých složek.

Stacionární fáze

Kapalinová chromatografie s vysokou účinností (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) je separační metoda používající kolony s vhodnou stacionární fází, jejíž vlastnosti umožňují analogicky jako u plynové chromatografie dosáhnout rychlé separace složitých směsí látek s vysokým rozlišením zón. Kontinuální separace látek se provádí na kolonách se stacionární fází o velmi malých částicích (3–10 μm) s úzkou distribucí velikosti (homogenní náplně), homogenním filmem zakotvené stacionární fáze. Stacionární fáze s velmi úzkou distribucí velmi malých částic umožňují vytvářet homogenní chromatografická lože v kolonách, jejíž účinnost se pohybuje obvykle v rozsahu 30–90 000 pater na metr. Vysoká účinnost chromatografických systémů s těmito stacionárními fázemi je především důsledkem snížení příspěvku vířivé difuze, snížení podílu molekulární difuze v kapalině a urychlení transportu hmoty mezi oběma fázemi. [23, 24]

Detekce

Nejběžněji používané způsoby detekce pro kvantifikaci L-askorbové kyseliny a jejich příbuzných sloučenin jsou ultrafialová (UV), elektrochemická (EC) a fluorescenční detekce. Při UV detekci L-askorbové kyseliny je používána vlnová délka blízká jejímu absorpčnímu maximu tj. 245 nm a 265 nm nebo často 254 nm. Maximální absorbance je závislá na pH. Při pH 2,0 je 245 nm a při pH 6,4 je maximální absorbance při 265 nm. UV absorbance je nejužitečnější na analýzu vysoce koncentrovaných vzorků jako jsou například multivitaminové a ovocné džusy. Naproti tomu techniky EC a fluorescenční detekce jsou více specifické. [22]

1.6.1 Veličiny používané k popisu chromatografické analýzy

Retenční čas (t_R) – jedná se o časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace analyzované složky detektorem. Z chromatogramu je odečítán jako vzdálenost mezi okamžikem nástřiku vzorku a maximem chromatografického píku, který odpovídá příslušné analyzované složce.

Retenční objem (V_R) – je objem mobilní fáze nutný k eluci složky zadržované v systému.

Mrtvý retenční čas (t_M) – jedná se o časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace analyzované složky detektorem. Daná složka není stacionární fází zadržována a pohybuje se rychlostí mobilní fáze.

Mrtvý retenční objem (V_M) – je objem mobilní fáze nutný k eluci složky nezadržované v systému, odpovídá objemu mobilní fáze v koloně.

Účinnost separace – separační účinnost chromatografické kolony se vyjadřuje výškou patra chromatografické kolony, neboli výškovým ekvivalentem teoretického patra H a počtem teoretických pater n vztahem:

$$H = \frac{L}{n}$$

kde L je délka chromatografické kolony.

Distribuční konstanta – během separace se v koloně neustále vytváří a porušuje fázová rovnováha mezi mobilní a stacionární fází. Dělená složka má při ustavení rovnováhy ve stacionární fázi koncentraci c_1 a v mobilní fázi koncentraci c_2 . Poměr mezi těmito koncentracemi se nazývá distribuční konstanta K_D a je definována vztahem:

$$K_D = \frac{c_1}{c_2}$$

Podmínkou pro úspěšné rozdělení dvou složek v separačním systému dvou fází je různá velikost distribuční konstanty K_D [23, 25, 26].

1.6.2 Instrumentace kolonové kapalinové chromatografie

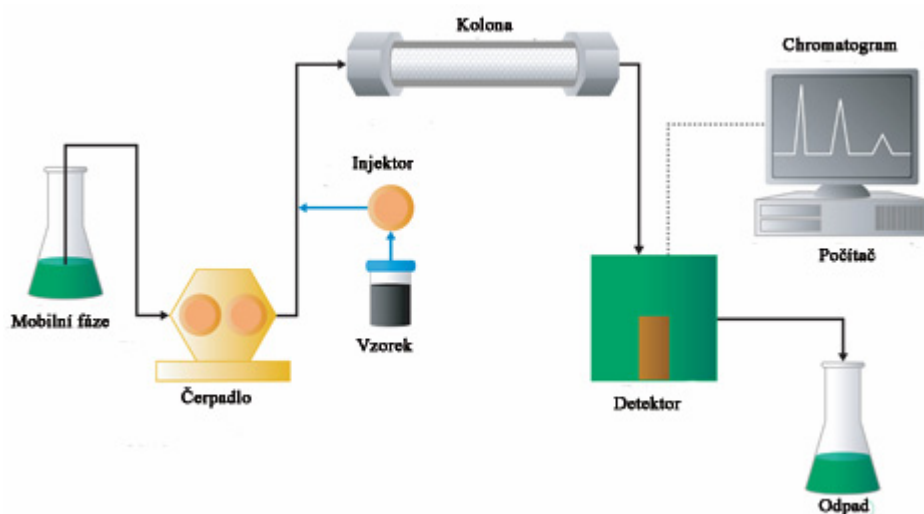
Instrumentaci kolonové kapalinové chromatografie lze rozdělit na:

- instrumentaci používanou v otevřených systémech (klasická kolonová kapalinová chromatografie)
- instrumentaci používanou v uzavřených systémech (vysoce účinná kapalinová chromatografie, moderní GPC, SEC a IEC)

Otevřené systémy pro kapalinovou chromatografii obsahují kolonu (skleněná trubice uzavřená na spodní i horní části kohoutem) se zásobníkem mobilní fáze a zařízení pro jímání eluátu (manuální nebo automatický sběrač frakcí). Dávkování vzorku se provádí nanesením vzorku pipetou nebo injekční stříkačkou přímo na vstup kolony při přerušném toku mobilní fáze, průtok mobilní fáze je řízen gravitací.

Eluce složek vzorku z kolony se sleduje měřením vhodné fyzikální vlastnosti mobilní fáze v jednotlivých frakcích eluátu, nebo stanovením obsahu separované látky jinou analytickou metodou.

Uzavřené systémy pro kolonovou kapalinovou chromatografii obsahují čerpadlo mobilní fáze, zařízení pro odplynění mobilní fáze, dávkovací zařízení, uzavřenou kolonu se stacionární fází, termostat kolon, detektor s průtočnou celou, vyhodnocovací zařízení.[24]



Obr. č. 12: Vysokoúčinná kapalinová chromatografie [27]

Čerpadla mobilní fáze

Čerpadla mobilní fáze

Základním požadavkem na čerpadla kapalně mobilní fáze je:

- dlouhodobá konstantnost průtoku s přesností menší než 2 %
- chemická inertnost částí čerpadla přicházejícího do kontaktu s kapalinou
- možnost regulace průtoku v dostatečně velkém rozsahu (0,1–10 ml.min⁻¹)
- pracovní tlak minimálně 10 MPa (lépe 20–40 MPa)

Podle technického řešení se rozlišují tři skupiny čerpadel:

- pneumatická čerpadla
- bezpulsní čerpadla, tzv. lineární dávkovače
- pulsni neboli reciproční čerpadla

1) **Pneumatická čerpadla**

Používají jako zdroj tlaku stlačený plyn, který je v přímém kontaktu s kapalinou nebo bývá oddělen od kapaliny pístem.

Výhody: velmi dobrá stabilita průtoku.

Nevýhody: obtížné zapojení do regulačního systému celého chromatografu.

2) **Bezpulsní čerpadla (Lineární dávkovače)**

Jsou to vysokotlaké válce objemu až 500 ml, do nichž je definovanou rychlostí zasouván píst. Rychlost pohybu pístu řízená krokovým motorem je přímo úměrná průtoku mobilní fáze. Lineární dávkovače jako jediný z dnes používaných typů čerpadel pro kapalinovou chromatografii poskytují bezpulsní konstantní tok mobilní fáze.

3) **Pulsní čerpadla (Reciproční čerpadla)**

Jsou tvořena válcem o objemu několika desetin mililitru. Mají dva zpětné ventily, které se při pravidelně se opakujícím pohybu pístu ve válci uzavírají nebo otevírají. Při nasávání kapaliny do vnitřního prostoru čerpadla je otevřen vstupní ventil a výstupní je uzavřen. Při vytlačování kapaliny z čerpadla je poloha ventilů obrácená. Reciproční čerpadla jsou konstruována jako pístová a membránová. V případě pístových čerpadel přichází mobilní fáze do styku s pístem, u membránových čerpadel je kapalina nasávána do prostoru odděleného od pístu membránou, která je prohýbána pomocnou kapalinou umístěnou v prostoru pístu.

Výhody:

- dlouhodobý nepřetržitý provoz
- možnost rychlé výměny čerpané kapaliny
- použití pro programovou změnu složení mobilní fáze během analýzy, tzv. gradientovou eluci (gradient složení mobilní fáze lze realizovat v nízkotlaké části chromatografu před čerpadlem mobilní fáze nebo se vysokotlaké části s použitím dvou a více čerpadel podle počtu smíchávaných komponent). [24]

Zařízení pro dávkování vzorku do chromatografického systému

Dávkovací zařízení slouží k vnesení vzorku do toku mobilní fáze ve formě úzkého koncentračního pulzu, tak aby bylo zabezpečeno minimální rozmytí vzorku v dávkovači a ve spojích mezi dávkovačem a chromatografickým ložem.

Septové dávkovače

Jsou obdobou dávkovačů používaných v plynové chromatografii, umožňující vnášení vzorků pomocí injekční stříkačky do bezprostřední blízkosti začátku chromatografického lože.

Výhody: variabilita objemu vnášeného vzorku.

Nevýhody: potřeba časté výměny používaného septa a menší přesnost dávkovaného objemu v porovnání s dávkovacími kohouty.

Dávkovací kohouty

Umožňují přesné a reprodukovatelné odměření objemu vzorku vnitřní nebo vnější dávkovací smyčkou.

Vnější dávkovací smyčku tvoří nerezová kovová kapilára, jejíž objem je obvykle 5 až 100 μl . Vzorek se nanáší do blízkosti začátku chromatografického lože vřazením dávkovací smyčky do proudu mobilní fáze otočením kohoutu z polohy plnění do polohy nástřik.

Menší objemy vzorků jsou zpravidla dávkovány kohouty s vnitřní smyčkou.

Kohouty se konstruují jako čtyřcestné a šesticestné, často jsou ovládány elektricky, především v případě, že jsou součástí automatických dávkovačů. [23]

Kolony

Stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii se plní do trubic různé délky a průměru, zhotovených z nerezové oceli, tvrzeného skla a plastů (polyetheretherketon – PEEK). [23]

Detektory

Detektory pro kapalinovou chromatografii jsou vesměs selektivní.

Požadovanými vlastnostmi jsou:

- okamžitá, lineární koncentrační odezva
- vysoká citlivost
- nízký šum
- minimální vliv změny tlaku, průtoku MF, teploty
- minimální příspěvek k rozšiřování zóny
- možnost použití gradientové eluce

Současné sestavy pro kapalinovou chromatografii jsou vybaveny optickými a elektrochemickými detektory s průtočnou celou, jejíž objem je menší než 10 μl .

Fotometrické a spektrofotometrické detektory

Pracují v ultrafialové a viditelné části spektra. Jsou konstruovány jako přístroje s jednou pevnou vlnovou délkou, nejčastěji 254 nm, přístroje filtrové s možností vymezit pomocí spektrálních filtrů vlnové délky např.: 254, 280, 313, 340, 365, 405, 436, 546 nm, přístroje s plynule měnitelnou vlnovou délkou 190–400 (600) nm, vybavené mřížkovým monochromátorem a přístroje umožňující volit nejvhodnější pracovní vlnovou délku ze spektra snímaného v průběhu celé analýzy fotodiodovým polem (diode array detektor, DAD). DAD umožňují mimo jiné zjistit „čistotu“ separovaných zón a pomáhají významně při identifikaci jednotlivých složek vzorek.

Výhody: vysoká univerzálnost, citlivost, použitelnost v gradientových technikách.

Fluorimetrický detektor

Je jedním z nejcitlivějších detektorů používaných v kapalinové chromatografii. Používá se k detekci látek vykazujících fluorescenci nebo látek, jejichž deriváty fluoreskují. Optické uspořádání je stejně jako u fotometrických detektorů shodné s uspořádáním běžných foto- a fluorimetrů.

Refraktometrické detektory

Pracují jako diferenciální měřiče změny indexu lomu mobilní fáze, tím že měří rozdíl indexu lomu mobilní fáze uzavřené v referenční cele a eluentem vycházejícím z kolony. Podmínkou přesné detekce refraktometrickým detektorem je možnost přísného temperování. Záznam pro eluovanou složku je v pozitivním nebo negativním směru od nulové linie. Detektor je méně citlivý než fotometrický a nelze ho použít při gradientové eluci.

Voltametrické (amperometrické) detektory

Používají se k detekci látek podléhajících redoxní reakci. Měří se proud mezi polarizovatelnou pracovní elektrodou a pomocnou elektrodou v závislosti na vloženém napětí nebo při konstantním napětí. Optimální je měření v tříelektrodovém systému proti srovnávací elektrodě. Používají se pro detekci fenolů, thiolů, peroxidů, aromatických aminů, ketonů, aldehydů, nitrolátek, nitrilů, esterů. Podmínkou je dobrá vodivost mobilní fáze.

Vodivostní detektory

Používají se k detekci nabitých látek (iontů) v iontové výměnné chromatografii. Sleduje se změna vodivosti mobilní fáze mezi dvěma platinovými nebo zlatými elektrodami s vloženým střídavým napětím.

Hmotnostní detektor

Má v kapalinové i plynové chromatografii specifické postavení jako detektor umožňující nejen detekci separovaných látek s vysokou citlivostí, ale především jako dominantní způsob identifikace jednotlivých složek. Přímé spojení kapalinového chromatografu s hmotnostním detektorem vyžaduje speciální interface vhodný pro odstranění přebytku mobilní fáze před vstupem do ionizační komory spektrometru. [23]

1.7 Stanovení vitamínu C

1.7.1 Metoda HPLC/UV

Metoda slouží ke stanovení kyseliny askorbové v nápojích, ovoci a zelenině, v rostlinných výrobcích a ve vitaminových výrobcích.

Kyseliny askorbové se z homogenizovaného materiálu extrahuje roztokem kyseliny metafosforečné. Po filtraci extraktu se její obsah stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí. Identifikace a kvantifikace se provádí metodou vnějšího standardu. [28]

Příprava laboratorního vzorku

Pevné vzorky: 20–25 g pevného vzorku se homogenizuje s 60–80 ml extrakčního činidla po dobu jedné minuty. Získaný extrakt se přefiltruje přes filtrační papír, který se několikrát propláchne; případně je možné využít filtrace za pomoci vakua. Filtrát se kvantitativně převede do 100 ml odměrné baňky a doplní po značku extrakčním činidlem. Všechny roztoky vzorků se před nástřikem do kapalinového chromatografu filtrují přes skládaný filtr, popř. membránový filtr.

Kapalné vzorky: tekuté materiály se po dokonalém promíchání (množství se volí podle předpokládaného obsahu, tak aby koncentrace v analyzovaném roztoku odpovídala rozsahu

kalibrace 30–120 mg.l⁻¹) převedou do 100 ml odměrné baňky a doplní vodou po značku. Před nástřikem do kapalinového chromatografu je nutné extrakt přefiltrovat přes membránový filtr. [28]

Stanovení HPLC

Analytická kolona: analytická kolona s RP C18 nebo RP C8 (250 x 4,6 mm, 5 mm) s předkolonkou, mobilní fáze: methanol:voda (5:95, v/v), (připravená mobilní fáze se odplyní v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut), průtok mobilní fáze: 1 ml.min⁻¹, detekce: UV 258 nm, objem nástřiku: 20 µl, teplota: laboratorní teplota. [28]

1.7.2 Další metody stanovení vitamínu C

Titrační metoda

Při stanovení kyseliny askorbové je důležitá příprava vzorku vzhledem k její oxylabilitě. Především u tuhých vzorků je třeba před homogenizací vytlačit vzduch z homogenizátora profouknutím inertním plynem (CO₂, N₂). Na zabránění oxidace kyseliny askorbové se při homogenizaci přidává kyselina monohydrogenfosforečná (metafosforečná) v koncentraci 2 % roztoku a mixuje se v proudu inertního plynu. Kapalně vzorky se jenom smíchají s kyselinou monohydrogenfosforečnou. Rychle přefiltrovaný vzorek (přes gázu) se musí ihned titrovat.

Principem stanovení je oxidačně-redukční reakce kyseliny askorbové s 2,6-dichlorfenolindofenolem (oxidační činidlo). Modře zbarvený 2,6-dichlorfenolindofenolem oxiduje kyselinu askorbovou na kyseliny dehydroaskorbovou a sám se redukuje na bezbarvou leukobázi. Reakce probíhá v kyselém prostředí. Po zreagování kyseliny askorbové nezredukované titrační činidlo zůstává zbarvené, avšak původně modrý tón se v důsledku kyselého prostředí vzorku mění na růžový.

Ve vzorcích, které jsou zbarvené, se doporučuje buď elektromagnetická indikace ekvivalentního bodu, nebo se stanoví přebytek 2,6-dichlorfenolindofenolu fotometricky.

Metoda slouží ke stanovení kyseliny askorbové v nápojích, v ovoci, zelenině a výrobcích z nich a ve vitaminových přípravcích. Tuto metodu lze použít pouze v nepřítomnosti interferujících látek. [28]

Spektrofotometrická metoda

Tato metoda je založena na měření vzniklého barevného produktu, který poskytuje kyselina dehydroaskorbová vzniklá oxidací bromem z kyseliny askorbové s činidlem s 2,4-dinitrofenylhydrazinem.

Polarografická metoda

Využívá ke stanovení kyseliny askorbové její oxidace na rtuťové kapkové elektrodě a redukce chinoxalinového derivátu, který vzniká kondenzací kyseliny dehydroaskorbové s o-fenylendiaminem. Tato metoda je velmi specifická a lze ji použít k stanovení vitamínu C ve všech potravinářských materiálech. [29]

Plynová chromatografie (GC) s plamenově ionizačním detektorem

Vzorek je nejprve zmrazen ve vialkách kapalným dusíkem a poté lyofilizován. Reakce s trimethylsilylem (TMS) je provedena s vysušeným zbytkem a 500 μ l hexamethyldisilazan (HMDS)/acetonitril (2:8) v mikrovlnné troubě po dobu 5 minut při 180 W. Vzorek je redukován dithiothreitem: 100 μ l filtrátu + 100 μ l DTT, 10 min.

Kolona: Chrompack (Middelburg, Nizozemí) (CP-Sil-5, 15 mm x 0,32 mm I.D., 0,25 μ m tloušťka náplně) teplota: 150 °C a potom 320 °C při 20 °C za min, potom s výdrží 320 °C po dobu 3 minut. 1 μ l byl nastříknut v poměru 100:1. [30]

Coulometrická titrace kyseliny askorbové jódem

Stanovení je založeno na oxidaci kyseliny askorbové jódem. Koncentrace titračního činidla (jódu) je až do dosažení bodu ekvivalence prakticky nulová, a proto biamperometrickým indikačním systémem neprochází proud. Za bodem ekvivalence s rostoucí koncentrací jódu proud vzrůstá, protože systém I_2/I^- se chová reverzibilně. Elementární jód je ve vodě jen nepatrně rozpustný. V přítomnosti nadbytku jodidu se snadno rozpouští za vzniku trijodidového anionu I_3^- (červenohnědé zbarvení, ve zředěném roztoku je pak žlutý).

Při reakci jódu se stanovovanou látkou nesmí být pH roztoku vyšší než 8, aby nedocházelo k rozkladu jódu na jodid a jodnan, popř. až na jodičnan. V silně kyselých roztocích zase dochází k pozvolné oxidaci jodovodíku vzdušným kyslíkem na jód.

Kyselina askorbová je stabilní při nízkém pH, v přítomnosti komplexotvorných či redukujících látek. Těmto podmínkám vyhovuje kyselina šťavelová, která udržuje nízké pH a má i slabé komplexotvorné vlastnosti. Vzdušný kyslík je možno odstranit probubláváním roztoku dusíkem. K omezení vlivu přítomných těžkých kovů je používána EDTA a siřičitan sodný. [31]

1.8 Validační parametry

Validace

Validaci můžeme definovat jako proceduru, jejímž cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií. Validace je zjednodušeně řečeno ověření platnosti zvoleného analytického postupu (metody). Vlastnost, která je předmětem validace se nazývá validovaná vlastnost (koncentrace hlavní látky, koncentrace nečistoty, fyzikálně chemický parametr). Validace se používá vždy při validaci nové metody, při převodu validované metody (např. z vývojové do přijímací laboratoře, publikované validované metody), při kontrole způsobilosti systému a při revalidaci metody, kdy podmínky revalidace jsou striktně stanoveny. [32]

1.8.1 Linearita

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou instrumentace (analytickým signálem) a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient (r). Při lineární závislosti nabývá hodnoty $+1$ a čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější. Lineární závislost dvou proměnných je matematicky vyjádřena obecným vztahem:

$$y = a + bx$$

kde parametr a je úsek (posunutí), parametr b je směrnice kalibrační přímky (regresní koeficient). Při výpočtu hodnot koeficientů a , b se vychází z platnosti modelu regresní závislosti, který předpokládá konstantní rozptyl pro všechny hodnoty závisle proměnné – použití metody nejmenších čtverců. [32]

1.8.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce

Mez detekce odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez detekce udává skutečnou úroveň signálu, která ještě umožňuje detekci koncentrace. U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost signálu signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že jsou k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Odezva meze detekce se stanoví jako 3-násobek kolísání základní linie. Koncentraci na mezi detekce se vypočítá z koncentrační závislosti výšky chromatografického píku. [32]

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je nejnižší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti. [33]

U separačních metod se používá k výpočtu meze stanovitelnosti velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Podmínkou je, že jsou k dispozici chromatogram slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie v oblasti dané 20-ti násobkem pološířky píku stanovovaného analytu. Odezva meze stanovitelnosti se stanoví jako 10-ti násobek kolísání základní linie. Koncentraci na mezi stanovitelnosti se vypočítá z koncentrační závislosti výšky chromatografického píku. [32]

1.8.3 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (podmínky, kdy navzájem nezávislé výsledky zkoušek se získají opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem za použití týchž přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí. [32]

Aritmetický průměr

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

kde n je počet měření.

Směrodatná odchylka s

Rozptýlení jednotlivých hodnot x_i okolo průměru \bar{x} je zpravidla charakterizováno hodnotou *směrodatné odchylky*

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}$$

Směrodatná odchylka je tedy mírou přesnosti výsledků stanovení. [34]

Relativní směrodatná odchylka RSD

Používá se pro porovnání směrodatné odchylky s průměrem serie měření. RSD vyjadřuje směrodatnou odchylku jako procento z průměru a vypočítá se podle následujícího vztahu

[34]:

$$RSD = 100 \cdot \frac{s}{\bar{x}}$$

1.8.4 Výtěžnost metody (správnost)

Recovery neboli výtěžnost udává poměr množství (koncentrační) analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě. Hodnota recovery se může vyjadřovat jako desetinný zlomek nebo v procentech. V případě, že srovnávací vzorek není dostupný, pak se použije referenční hodnota certifikovaného retenčního materiálu nebo se použije referenční hodnota získaná jinou nezávislou metodou resp. metodami nebo se použije vzorků s přídavkem analytu (standardní přídavek). Vnesení přídavku by se mělo provést v takovém kroku analytického postupu, aby byl postižen celý pracovní postup. [32]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité pomůcky

- Běžné laboratorní sklo
- Büchnerova nálevka
- Celulózové mikrofiltry (0,45 µm) – CHROMSERVIS, ČR
- Filtrační papír
- Injekční stříkačky (2 ml) – CHIRANA INJECTA, SR
- Mikropipeta – BIOHIT, Finsko
- Mikrostříkačka (25 µl) – HAMILTON, USA
- Třecí miska s tloučkem
- Vývěva

2.2 Přístroje

- Analytické digitální váhy, GR-202-EC, A&D INSTRUMENTS, USA
- Breeze – software, pomocí nějž byl obsluhován HPLC systém
- HPLC přístroj - WATERS, USA, čerpadlo: Waters 1515 Isocratic HPLC Pump, UV detektor: Waters 2487 Dual Absorbance Detector
- Chladnička s mrazničkou, AMICA, Polsko
- Počítač DELL
- Předvážky EK-600H - A&D INSTRUMENTS, USA
- Přístroj na přípravu demineralizované vody – WATREX, ČR
- Ultrazvuková lázeň – KRAINTEK, SR

2.3 Chemikálie

- Dihydrogenfosforečnan draselný - MERCK, Německo
- DL-Dithiothreitol - SIGMA-ALDRICH, USA
- Kyselina L-askorbová - RIEDEL-DE HAËN, Německo
- Kyselina monohydrogenfosforečná - SIGMA-ALDRICH, USA
- Methanol - SIGMA-ALDRICH, USA
- Redestilovaná voda - FCH VUT, Brno

2.4 Stanovení vitaminu C na standardech

2.4.1 Příprava roztoků

Příprava mobilní fáze

Mobilní fáze byla tvořena směsí methanolu a vodného roztoku KH_2PO_4 . Navážka 6,8 g dihydrogenfosforečnanu draselného byla rozpuštěna ve 450 ml redestilované vody. Poté bylo přidáno 50 ml methanolu a tento roztok byl v zásobní lahvi odplyněn v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Příprava extrakčního činidla

Použitým extrakčním činidlem byl 2% roztok kyseliny monohydrogenfosforečné. Navážka 30 g kyseliny monohydrogenfosforečné byla rozpuštěna v 470 ml redestilované vodě. Nejprve byla kyselina monohydrogenfosforečná rozpuštěna v asi 100 ml horké vodě a poté byl přidán zbytek vody o laboratorní teplotě. Roztok byl uchováván v lednici.

Příprava zásobního standardního roztoku kyseliny askorbové

Byl používán zásobní roztok o koncentraci 1 g.l^{-1} . Bylo naváženo 0,0250 g kyseliny askorbové. Toto množství bylo rozpuštěno v 2% roztoku kyseliny monohydrogenfosforečné, roztok byl kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 25 ml a doplněn po značku. Roztok byl připraven těsně před stanovením kvůli jeho nestabilitě.

2.5 Stanovení vitaminu C v plodech dřínu obecného

Obsah vitaminu C byl analyzován na devíti vybraných odrůdách dřínu: Vydubecký, Sejanec gruševídnovo, Elegantní, Jolico, Vyšegorodský, Devín, Fruchtal, Lukjanovský a Olomoucký. Z každé odrůdy byly vždy připraveny tři vzorky, přičemž každý extrakt byl analyzován třikrát.

Příprava vzorků

Ke stanovení vitaminu C byly použity plody dřínu obecného, které byly uchovávány v mrazáku po dobu 2 let.

Na digitálních analytických vahách byly naváženy 4 g zmražených plodů z vybrané odrůdy dřínu obecného s přesností na čtyři desetinná místa. Tato navážka byla rozmělněna spolu s malým množstvím extrakčního činidla tloučkem v třecí misce včetně pecek, vše bylo následně přefiltrováno přes filtrační papír za vakua. Filtrát byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky a doplněn po značku 2% roztokem kyseliny monohydrogenfosforečné.

Po promíchání vzorku byla část nasáta do stříkačky přes celulóзовý filtr a ručně třikrát nastříknuta do chromatografu.

HPLC analýza

Vzorky byly vždy ručně dávkovány a bylo provedeno měření pomocí HPLC. Separace proběhla na koloně Gemini C18, rozměry 150 x 4,6 mm s průměrem částic 5 μm , byla zde umístěna i předkolona: Gemini C18 4 x 3 mm (Phenomenex, USA). Pro izokratickou eluci byl použit fosfátový pufr a jako extrakční činidlo kyselina monohydrogenfosforečná.

Podmínky HPLC analýzy:

- teplota kolony: 30°C
- teplota nástřiku: 25°C
- objem nástřiku: 20 µl
- průtok mobilní fáze: 1 ml.min⁻¹
- UV detekce: 254 nm

Analýza trvala 4 minuty, přičemž retenční čas kyseliny askorbové byl 2,1 minuty. Retenční čas kyseliny monohydrogenfosforečné se pohyboval okolo 1,7 minuty. Po analýze byla kolona 4 minuty proplachována mobilní fází z důvodu odstranění jiných možných detekovatelných látek, které by mohly ovlivňovat další analýzu. Kyselina askorbová byla identifikována porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech roztoků jednotlivých vzorků a z roztoku standardu.

2.6 Stanovení vitaminu C v plodech jeřábu obecného

Obsah vitaminu C byl analyzován na šesti odrůdách jeřábu obecného: Běloplodý, Burka, Granatina, Lionora springer, Velved a Titan. Tyto plody byly skladovány v mrazáku po dobu 2 let. Z jednotlivých odrůd byly připraveny vždy tři vzorky a každý byl třikrát analyzován.

Příprava vzorků

Na digitálních vahách bylo naváženo 5 až 6 g zmražených plodů jeřábu obecného s přesností na čtyři desetinná místa. Navážka byla homogenizována s malým množstvím extrakčního činidla v třecí misce, přefiltrována za vakua přes Büchnerovu nálevku a roztok kvantitativně převeden do odměrné baňky a doplněn po značku 2% roztokem kyseliny monohydrogenfosforečné.

Roztok byl pro promíchání nasát do stříkačky přes celulózový filtr a ručně třikrát dávkován do chromatografu.

HPLC analýza

Analýza trvala 4 minuty, přičemž retenční čas kyseliny askorbové byl 2,1 minuty. Po analýze byla kolona proplachována 8 minut mobilní fází.

2.7 Stanovení celkového vitaminu C – redukce kyseliny dehydroaskorbové na askorbovou

2.7.1 Příprava roztoků

Příprava mobilní fáze, extrakčního činidla i zásobního standardního roztoku byly stejné jako v 2.4.1.

Příprava redukčního roztoku

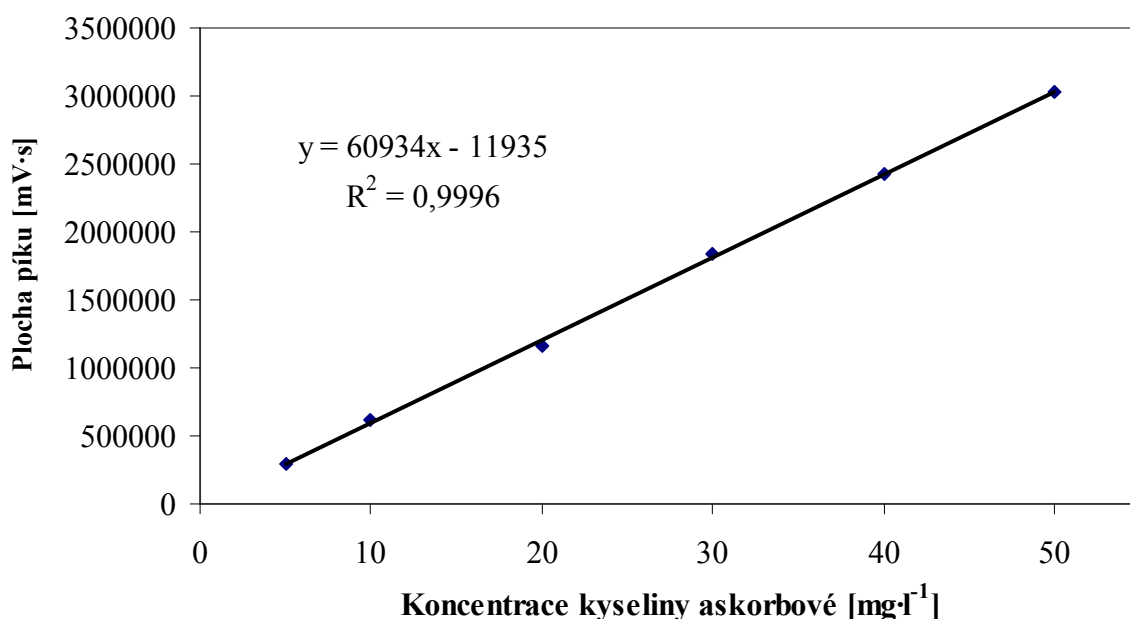
Jako redukční roztok byl používán dithiothreitol ve vodě. Bylo naváženo 10, 15 a 20 mg DTT, poté byla jednotlivá množství smíchána s redestilovanou vodou o objemu 1 ml v Eppendorfově mikrozkuhavce. [35]

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Stanovení validačních parametrů

3.1.1 Linearita odezvy detektoru

Byla sestrojena kalibrační křivka pomocí softwaru Microsoft Excel a to jako závislost plochy píku na koncentraci standardních roztoků. Na obr. č. 13 je uvedena kalibrační závislost pro koncentrace 5, 10, 20, 30, 40 a 50 mg.l⁻¹. V tab. č. 9 jsou uvedena data k této kalibrační závislosti.



Obr. č. 13: Kalibrační závislost kyseliny askorbové

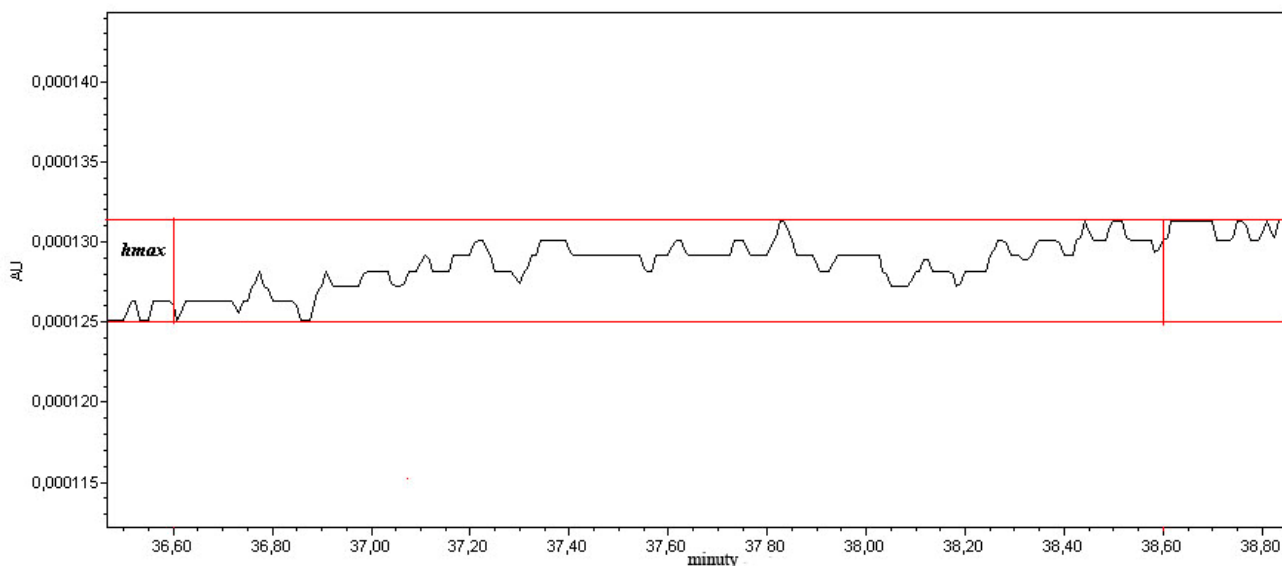
Tab. č. 9: Data ke kalibrační křivce kyseliny askorbové

Koncentrace [mg.l ⁻¹]	5	10	20	30	40	50
Průměr plochy píků	291439	615237	1167321	1841190	2427900	3030008

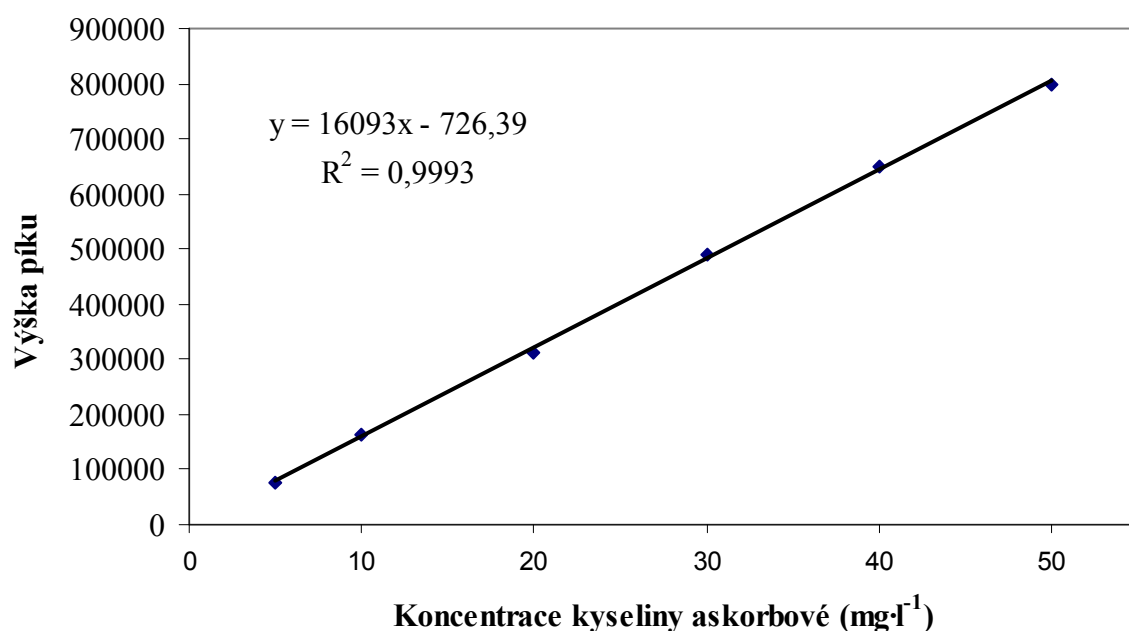
Linearita odezvy detektoru byla ověřována v rozsahu koncentrací 5 až 50 mg.l⁻¹. Standardní roztok i jednotlivé koncentrace kyseliny askorbové byly připraveny v den stanovování a ihned analyzovány, případně mezi jednotlivými analýzami uchovány ve tmě, kvůli jejich nestabilitě. Každá koncentrace byla analyzována 3x a výsledné plochy píků byly zprůměrovány. Korelační koeficient stanovované závislosti nesmí být nižší než 0,9800. Nalezená hodnota korelačního koeficientu 0,9996 tuto podmínku splňuje.

3.1.2 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Ze záznamu šumu detektoru bylo určeno maximální kolísání základní linie $h_{max} = 6,0$ v oblasti dané dvacetinásobkem pološířky píku. Z chromatografu standardu byla určena pološířka píku, která je 0,1 min. Dvacetinásobek pološířky píku odpovídá 2 min. Závislost výšky chromatografického píku na koncentraci kyseliny askorbové je na obr. č. 15, směrnice této závislosti je $b_I = 16093$.



Obr. č. 14: Maximální kolísání základní linie



Obr. č. 15: Závislost výšky chromatografického píku na koncentraci kyseliny askorbové

Mez detekce:

$$y_D = 3 \cdot h_{\max}$$

$$y_D = 3 \cdot 6,0$$

$$y_D = 18$$

$$x_D = \frac{y_D}{b_1}$$

$$x_D = \frac{18}{16093}$$

$$x_D = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$$

Mez stanovitelnosti:

$$y_S = 10 \cdot h_{\max}$$

$$y_S = 10 \cdot 6,0$$

$$y_S = 60$$

$$x_S = \frac{y_S}{b_1}$$

$$x_S = \frac{60}{16093}$$

$$x_S = 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$$

Byla vypočítána mez detekce $x_D = 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ a mez stanovení měření na $x_S = 3,7 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$.

3.1.3 Opakovatelnost měření

Opakovatelnost měření byla stanovena opakovanými analýzami čtyř standardních roztoků kyseliny askorbové o koncentracích 10, 20, 40 a 50 mg.l^{-1} . Ze vzorků plodů dřínu byly vybrány dvě náhodné odrůdy a to Elegantní a Jolico, od každé odrůdy připraveny vždy dva vzorky a 6x dávkovány. Výsledky jsou uvedeny v tab. č. 10 a v tab. č. 11. Opakovatelnost stanovení byla vyjádřena hodnotou RSD.

Tab. č. 10: Opakovatelnost měření - standardy

Měření	Koncentrace [mg.l^{-1}]			
	10	20	40	50
	Plocha píku			
1	608285	1164556	2407741	3044041
2	612288	1172170	2463735	3041135
3	625139	1165237	2412224	3004849
4	613979	1148186	2417723	2978442
5	605713	1149325	2493927	2963293
6	570918	1191424	2511644	2962162
Průměr	606054	1165150	2451166	2998987
Směrodatná odchylka	16859,9	14595,5	41159,7	33894,2
RSD [%]	2,78	1,25	1,68	1,13

Tab. č. 11: Opakovatelnost měření - vzorky

Měření	Odrůda			
	Elegantní		Jolico	
	Plocha píku		Plocha píku	
1	1147534	846830	1746045	1676411
2	1162979	877642	1723992	1725237
3	1179283	884445	1697049	1666935
4	1183367	884871	1694303	1691282
5	1166004	885034	1671053	1720453
6	1152519	893404	1785081	1698032
Průměr	1165281	878704	1719587	1696392
Koncentrace [mg.l ⁻¹]	19,3	14,5	56,8	56,0
Směrodatná odchylka	12953,8	14967,9	37664,5	21239,6
RSD [%]	1,11	1,70	2,19	1,25

3.1.4 Výtěžnost

Výtěžnost byla stanovována metodou standardních přídavek u dvou odrůd - Elegantní a Jolico. Nejprve byly analyzovány vzorky bez přídavku a potom s přídavkem známého množství kyseliny askorbové. Každý vzorek, s přídavkem i bez přídavku, byl 4x dávkován, plochy píků byly zprůměrovány, vypočítány koncentrace a z nich výtěžnost. Výsledky stanovení výtěžnosti jsou uvedeny v tabulkách tab. č. 12 a tab. č. 13.

Tab. č. 12: Výtěžnost metody u odrůdy Elegantní

Elegantní			
Vzorek č. 1			
Bez přídavku		S přídavkem	
ø koncentrace c_m [mg.100g ⁻¹]	8,0	ø koncentrace c_p [mg.100g ⁻¹]	15,3
Přídavek kyseliny askorbové: c_s [mg.100g ⁻¹]			8,3
Výtěžnost [%]			88,82
Vzorek č. 2			
Bez přídavku		S přídavkem	
ø koncentrace c_m [mg.100g ⁻¹]	7,1	ø koncentrace c_p [mg.100g ⁻¹]	13,9
Přídavek kyseliny askorbové: c_s [mg.100g ⁻¹]			9,9
Výtěžnost [%]			68,47
Vzorek č. 3			
Bez přídavku		S přídavkem	
ø koncentrace c_m [mg.100g ⁻¹]	8,9	ø koncentrace c_p [mg.100g ⁻¹]	20,3
Přídavek kyseliny askorbové: c_s [mg.100g ⁻¹]			11,1
Výtěžnost [%]			103,38

Tab. č. 13: Výtěžnost metody u odrůdy Jolico

Jolico			
Vzorek č. 1			
Bez přidavku		S přidavkem	
ø koncentrace c_m [mg.100g ⁻¹]	23,3	ø koncentrace c_p [mg.100g ⁻¹]	26,5
Přídavek kyseliny askorbové: c_s : [mg.100g ⁻¹]			4,1
Výtěžnost [%]			79,22
Vzorek č. 2			
Bez přidavku		S přidavkem	
ø koncentrace c_m [mg.100g ⁻¹]	23,1	ø koncentrace c_p [mg.100g ⁻¹]	25,6
Přídavek kyseliny askorbové: c_s : [mg.100g ⁻¹]			4,2
Výtěžnost [%]			60,28
Vzorek č. 3			
bez přidavku		S přidavkem	
ø koncentrace c_m [mg.100g ⁻¹]	22,8	ø koncentrace c_p [mg.100g ⁻¹]	26,5
Přídavek kyseliny askorbové: c_s : [mg.100g ⁻¹]			4,9
Výtěžnost [%]			75,66

Metoda má dobrou výtěžnost, pokud se výsledek stanovení nachází v intervalu 90 až 105 %. [32] Nalezená výtěžnost aplikované metody stanovení vitamínu C se pohybovala v rozmezí 60,28–103,38 %. Ze šesti dílčích stanovení výtěžností se do požadovaného intervalu dostala jen jedna hodnota výtěžnosti - 103,38 %, ostatní výsledky jsou pod spodní hranici požadovaného intervalu. Nižší hodnoty výtěžnosti mohly být způsobeny nedostatečným zhomogenizováním vzorků, což se provádělo vzhledem k dosti velkým peckám velmi špatně. Dále mohly být výsledky ovlivněny přidávaným roztokem kyseliny askorbové. Vzhledem k jeho nestabilitě mohlo dojít k nepatrným ztrátám, což se však ve výsledné hodnotě mohlo objevit.

3.2 Stanovení vitamínu C ve vybraných druzích ovoce

Vitamin C ve vybraných odrůdách ovoce byl stanoven podle normy ČSN EN 14130: Potraviny – Stanovení vitamínu C metodou HPLC. [1]

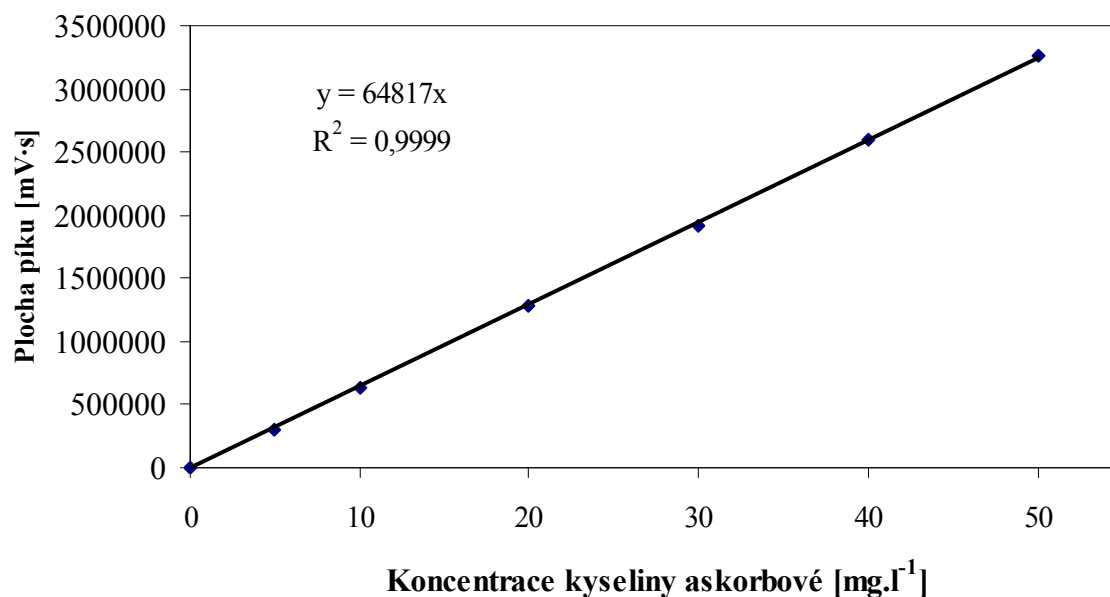
3.2.1 Stanovení vitamínu C v plodech dřínu obecného

Sestrojení kalibrační závislosti

Z připraveného zásobního standardního roztoku kyseliny askorbové o koncentraci 1.g⁻¹ byly postupně připraveny jednotlivé pracovní standardy o koncentracích 5, 10, 20, 30, 40 a 50 mg.l⁻¹. Do 10 ml odměrných baněk bylo napipetováno 0,05 ml, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,3 ml, 0,4 ml a 0,5 ml připraveného zásobního standardního roztoku kyseliny askorbové a ihned byly odměrné baňky doplněny po značku 2% roztokem kyseliny monohydrogenfosforečné. Pomocí připravených standardních roztoků byla sestrojena kalibrační křivka obr. č. 16 jako závislost plochy píku na koncentraci.

Tab. č. 14: Naměřená data použité k sestavení kalibrační závislosti

Koncentrace (mg.l ⁻¹)	plocha píku (μV.s)
5	306 388
10	640 380
20	1 290 665
30	1 923 013
40	2 594 703
50	3 257 675



Obr. č. 16: Kalibrační závislost

Stanovení vitamínu C v různých odrůdách dřínu obecného

U každé analyzované odrůdy byly vždy naváženy tři vzorky, z nich připraveny tři roztoky a každý zvlášť byl 3x nadávkován a analyzován.

Analýza každého vzorku trvala 4 minuty. Retenční čas kyseliny askorbové byl 2,1 minuty, což je vidět na ukázce chromatogramu na obr. č. 17. Retenční čas kyseliny monohydrogenfosforečné se pohyboval okolo 1,7 minuty. Po analýze byla kolona 4 minuty proplachována mobilní fází z důvodu odstranění jiných možných detekovatelných látek, které by mohly ovlivňovat další analýzu.

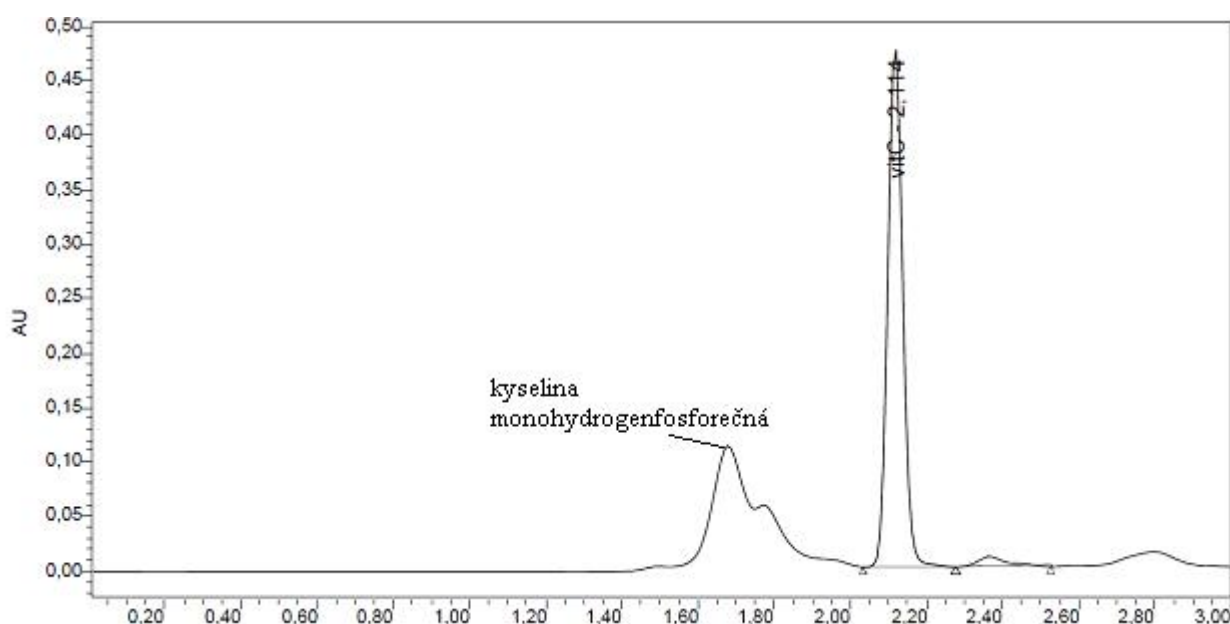
Kyselina askorbová byla identifikována porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech roztoků jednotlivých vzorků a z roztoku standardu.

Integrací v programu Breeze byla vypočtena plocha píku kyseliny L-askorbové v jednotlivých vzorcích. Pomocí regresní rovnice kalibrační závislosti byla stanovena koncentrace vitamínu C v daných roztocích.

Dále byla tato zjištěná hodnota přepočtena na hmotnost navážky původního vzorku a vyjádřena v mg na 100 g plodů dle vztahu:

$$c = \frac{x \cdot V}{m} \cdot 0,1$$

kde c je výsledná koncentrace vitaminu C přepočtená na 100 g plodů [$\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$], x je koncentrace vitaminu C vypočtená z regresní rovnice kalibrační závislosti [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$], V [ml] je objem ve kterém byla rozpuštěna navážka plodů, m [g] je hmotnost jednotlivých navážek plodů k analýze a $0,1$ je pomocný koeficient pro přepočet koncentrace na 100 g plodů. Vypočítaný obsah vitaminu C k jednotlivým odrůdám je uveden v příloze č.1. Následně vypočítané koncentrace u jednotlivých vzorků byly zprůměrovány a vypočítána celková koncentrace obsahu kyseliny askorbové ke každé odrůdě viz tab. č. 15.



Obr. č. 17: Ukázka chromatogramu vzorku odrůdy Vydubecký

Tab. č. 15: Obsah vitaminu C v jednotlivých odrůdách dřínu obecného

Odrůda	Množství kyseliny askorbové [$\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$]			
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Průměr
Vydubecký	14,4	15,2	16,3	15,3
Sejanec.gruševidnovo	4,4	3,8	2,9	3,7
Elegantní	8,4	7,8	8,6	8,3
Jolico	27,4	18,9	21,9	22,7
Vyšegorodský	7,7	6,9	6,8	7,1
Devín	15,8	18,5	7,4	13,9
Fruchtal	30,7	22,3	25,1	26,1
Lukjanovský	4,2	4,0	3,3	3,8
Olomoucký	5,5	9,7	6,8	7,3

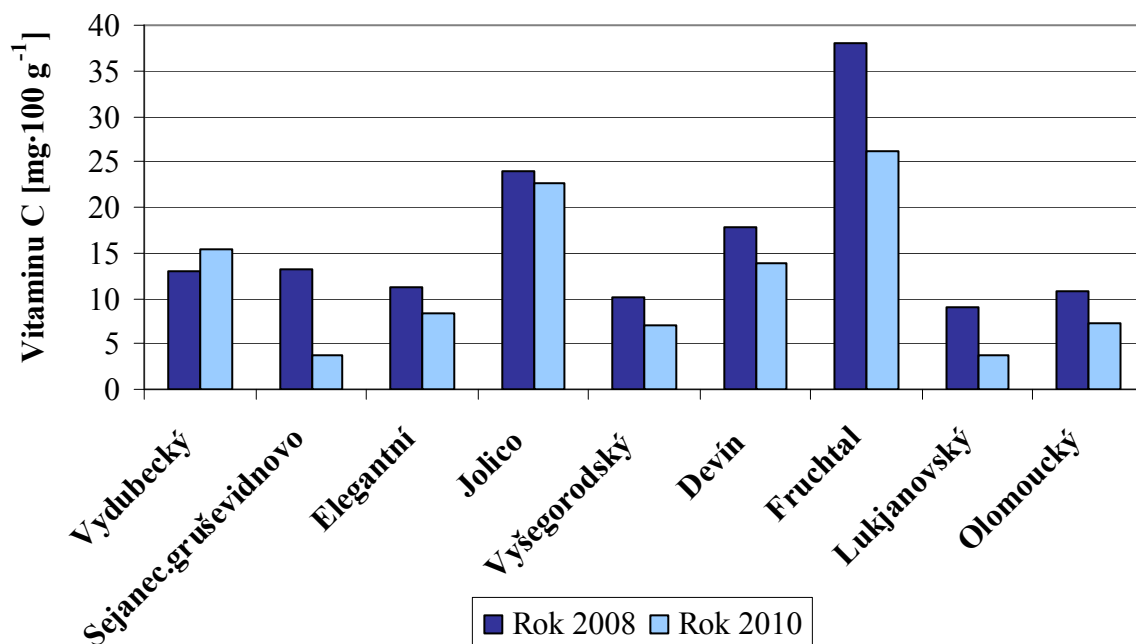
Srovnání hodnot obsahu vitamínu C v jednotlivých odrůdách

Stanovené hodnoty obsahu vitamínu C je možno srovnat s hodnotami, které byly získány před dvěmi lety [36]. Byly analyzovány odrůdy ze stejného sběru, které byly skladovány v mrazničce po dobu dvou let. Jak je možno vidět na obr. č. 18 u všech odrůd došlo ke snížení obsahu vitamínu C. Na degradaci mělo vliv dlouhodobé skladování, teploty, oxidace a v neposlední řadě i účinek světla.

Nejméně vitamínu C bylo stanoveno u odrůdy Lukjanovský a to pouhých 3,8 mg na 100 g plodů, naopak největší množství bylo zjištěno u odrůdy Fruchtal, jehož hodnota byla 26,1 mg ve 100 g plodů. Pokles obsahu C vitamínu činil od 5 % do 72 %.

Tab. č. 16: Hodnoty obsahu vitamínu C v různých odrůdách dřínu obecného analyzovaných v roce 2008 a 2010

Obsah vitamínu C v odrůdách dřínu [mg.100g ⁻¹]		
Odrůda	Průměr r. 2008	Průměr r. 2010
Vydubecký	12,9	15,3
Sejanec.gruševidnovo	13,2	3,7
Elegantní	11,2	8,3
Jolico	23,9	22,7
Vyšegorodský	10,1	7,1
Devín	17,9	13,9
Fruchtal	38,0	26,1
Lukjanovský	9,1	3,8
Olomoucký	10,7	7,3



Obr. č. 18: Srovnání obsahu vitamínu C jednotlivých odrůd dřínu obecného

3.2.2 Stanovení vitamínu C v plodech jeřábu obecného

Od každé odrůdy byly připraveny 3 vzorky a každý 3x nadávkován a analyzován. Následně byly získány hodnoty ploch píků, které byly použity k výpočtům koncentrací jednotlivých vzorků, jejichž hodnoty jsou v tab. č. 17. Výsledné koncentrace vitamínu C u různých odrůd jeřábu obecného byla určena jako průměr koncentrací příslušných vzorků

Analýza trvala 4 minuty, přičemž retenční čas kyseliny askorbové byl 2,1 minuty. Po analýze byla kolona 8 minut proplachována mobilní fází. Kyselina askorbová byla identifikována porovnáním retenčních časů píků na chromatogramech roztoků jednotlivých vzorků a z roztoku standardu viz obr. č. 13.

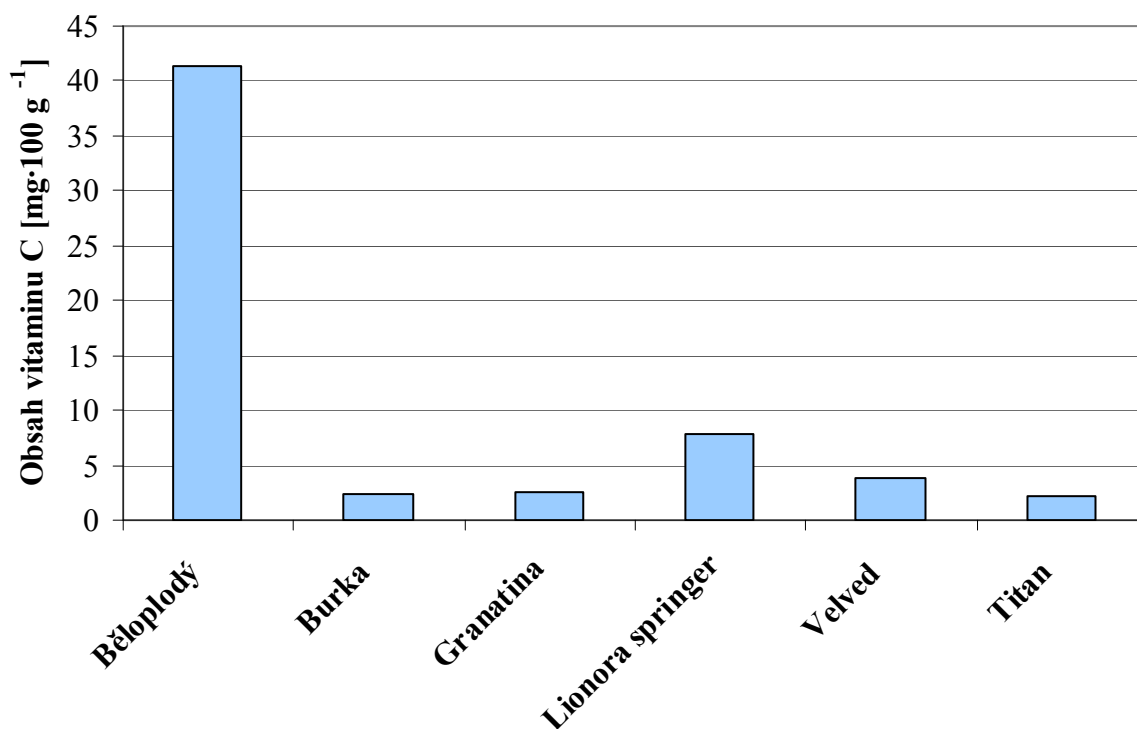
Integrací v programu Breeze byla vypočtena plocha píku askorbové kyseliny v jednotlivých vzorcích. Pomocí regresní rovnice kalibrační závislosti byla stanovena průměrná koncentrace vitamínu C v daných roztocích. Zjištěná hodnota byla přepočtena na hmotnost navážky původního vzorku a vyjádřena v mg na 100 g plodů dle vztahu:

$$c = \frac{x \cdot V}{m} \cdot 0,1$$

kde c je výsledná koncentrace vitamínu C přepočtená na 100 g plodů [$\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$], x je koncentrace vitamínu C vypočtená z regresní rovnice kalibrační závislosti [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$], V [ml] je objem ve kterém byla rozpuštěna navážka plodů, m [g] je hmotnost jednotlivých navážek plodů k analýze a $0,1$ je pomocný koeficient pro přepočet koncentrace na 100 g plodů. Vypočítaný obsah vitamínu C k jednotlivým odrůdám je uveden v tab. č. 15.

Tab. č. 17: Obsah vitamínu C v jednotlivých odrůdách jeřábu obecného

Odrůda	Množství kyseliny askorbové [$\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$]			
	Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Průměr
Běloplodý	38,8	43,4	41,9	41,3
Burka	2,5	2,4	2,1	2,3
Granatina	2,6	2,9	2,3	2,6
Lionora springer	8,3	8,1	7,2	7,8
Velved	4,7	4,0	3,1	3,9
Titan	2,0	2,4	2,2	2,2



Obr. č. 19: Obsah vitamínu C v různých odrůdách jeřábu obecného

Jeřabiny mohou obsahovat až 60 mg vitamínu C na 100 g plodů [37]. Překvapivě vysoký obsah vitamínu C oproti ostatním odrůdám byl stanoven v bezbarvé odrůdě Běloplodý a to 41,30 mg.100g⁻¹ proti průměru 3,77 mg.100g⁻¹, naopak nejmenší koncentrace byla analyzována u odrůdy titan 2,20 mg.100g⁻¹. K určitým ztrátám vitamínu C, oproti čerstvým plodům, mohlo dojít během skladování, neboť vzorky byly uloženy v mrazáku po dobu 2 let.

3.3 Stanovení celkového vitamínu C – redukce dehydroaskorbové kyseliny na askorbovou kyselinu

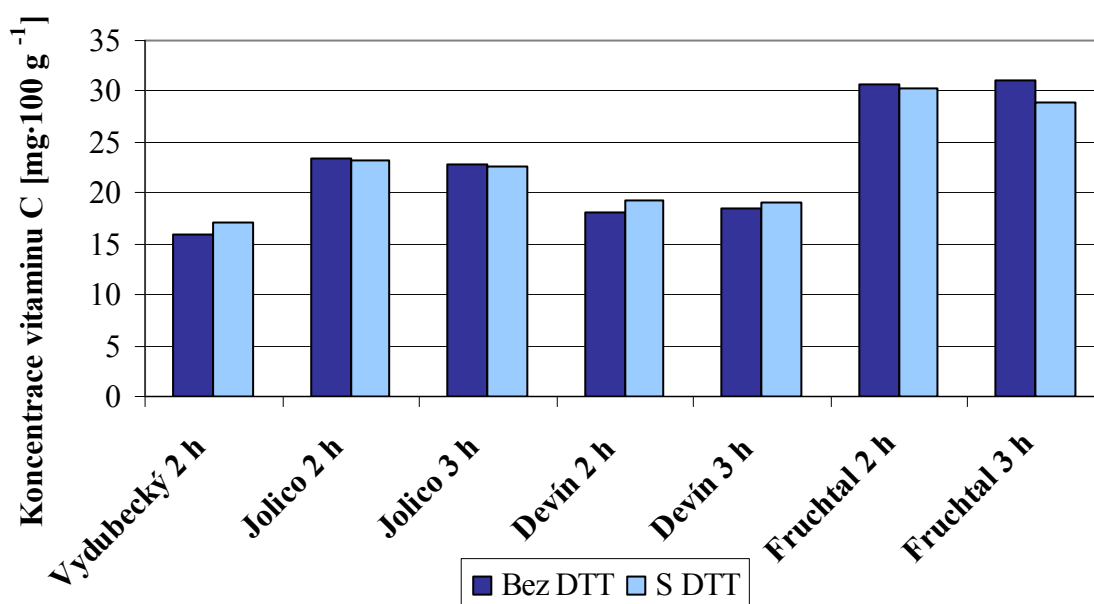
Příprava vzorků

Pracovní postup přípravy vzorků je uveden v kapitole 2.7.1. Dále bylo pracováno s filtrátem: 0,8 ml filtrátu bylo napipetováno spolu s 0,2 ml roztoku DTT do mikrozkušavky, vše bylo důkladně promícháno a ponecháno 2 a 3 hodiny v temnu při laboratorní teplotě. Zároveň byl připraven i srovnávací vzorek bez DTT použitím 0,2 ml redestilované vody a 0,8 ml filtrátu. Po uplynutí potřebné doby byl vzorek nasát do stříkačky přes celulóžový mikrofiltr a ručně třikrát nastříknut do chromatografu.

Byly proměřeny vzorky jak s DTT, tak slepé vzorky bez DTT, aby mohl být srovnán účinek redukce dehydroaskorbové kyseliny na askorbovou kyselinu. Nejprve bylo měření prováděno na náhodně vybraných odrůdách dřínu obecného, jehož roztoky s přídavkem DTT byly ponechány ve tmě 2 a 3 hodiny a poté byly testovány jednotlivé koncentrace DTT na redukci vitamínu C.

Tab. č. 18: Srovnání obsahu vitamínu C po redukci a bez redukce DTT

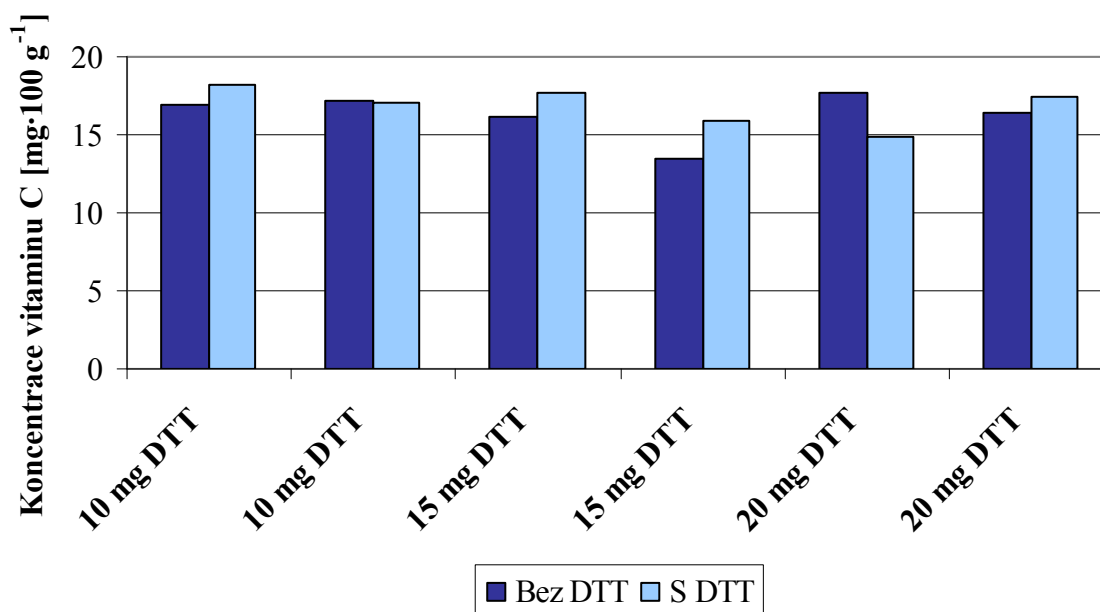
Odrůda		Koncentrace AA [mg.100g ⁻¹]	Celkový vitamin C [mg.100 ⁻¹]
Vydubecký	(po 2 hod)	15,9	17,1
Jolico	(po 2 hod)	23,5	23,3
	(po 3 hod)	22,8	22,6
Devín	(po 2 hod)	18,1	19,3
	(po 3 hod)	18,4	19,1
Fruchtal	(po 2 hod)	30,8	30,2
	(po 3 hod)	31,1	29,0



Obr. č. 20: Srovnání obsahu vitamínu C před a po redukci pomocí DTT

Tab. č. 19: Srovnání množství použitého DTT při stanovení celkového vitamínu C

Odrůda	Množství DTT (mg)	Čas	Koncentrace AA [mg.100 ⁻¹]	Celkový vitamin C [mg.100 ⁻¹]
Vydubecký	10	(po 2 hod)	16,9	18,2
		(po 3 hod)	17,1	17,1
	15	(po 2 hod)	16,2	17,7
		(po 3 hod)	13,5	15,9
	20	(po 2 hod)	17,6	14,9
		(po 3 hod)	16,4	17,4



Obr. č. 21: Použití různých koncentrací DTT k redukci kyseliny dehydroaskorbové na kyselinu askorbovou

Jen u některých testovaných vzorků došlo po působení DTT k malému vzrůstu hodnot obsahu vitamínu C. K lepším výsledkům a ke zjištění přesnějšího množství obsahu dehydroaskorbové kyseliny u vitamínu C by bylo zapotřebí vyzkoušet ještě i jiné redukční činidlo, např. TCEP, případně ověřit účinnost redukčních schopností DTT na samotné kyselině dehydroaskorbové, které bohužel, jak TCEP, tak DHA nebyly k dispozici.

4 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly popsány dřín obecný (*Cornus mas*) a jeřáb obecný (*Sorbus aucuparia*), které patří do skupiny méně známého ovoce. Jejich plody mají význam jak ze zdravotního hlediska, kvůli obsahu významných biologicky aktivních látek, především vitamínu C, ale i jiných a to například antokyanů neboli přírodních barviv. Jsou také významné v potravinářství, díky využitelnosti a zpracovatelnosti jejich plodů.

Další kapitola se zabývá vitaminem C a to především jeho chemickými vlastnostmi a významem pro lidské zdraví. Dále jsou zde popsány metody stanovení vitamínu C, především je brán zřetel na vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii.

Pomocí HPLC metody a vybraného postupu byl dále v experimentální části stanoven vitamin C jako kyselina askorbová v různých odrůdách dřínu a jeřábu.

Nejprve byla hodnocena vhodnost metody HPLC a to pomocí validace, kdy byly posuzovány jednotlivé parametry: linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti, opakovatelnost a výtěžnost. Závislost analytického signálu na koncentraci kyseliny askorbové vykazuje velmi dobrou linearitu. Mez detekce byla stanovena na $1,1 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$ a mez stanovitelnosti $3,7 \cdot 10^{-3} \text{ mg.l}^{-1}$. Opakovatelnost vyjádřená hodnotami RSD se pohybovala 1,11–2,78 %. Výtěžnost byla stanovena metodou standardních přídavek a pohybovala se v rozmezí 60,28–103,38 %.

U dřínu bylo analyzováno devět odrůd: Devín, Elegantní, Fruchtal, Jolico, Lukjanovský, Olomoucký, Sejanec gruševidno, Vydubecký a Vyšegorodský. Po analýze vzorků bylo zjištěno, že nejvíce vitamínu C obsahuje odrůda Fruchtal, u které bylo nalezeno množství 26,1 mg vitamínu C na 100 g plodů, naopak nejméně vitamínu C bylo zjištěno u odrůdy Sejanec gruševidno, jehož množství činilo pouze 3,7 mg vitamínu C na 100 g plodů. Poměrně vysoké množství bylo nalezeno i u odrůdy Jolico ($22,7 \text{ mg.100g}^{-1}$), Vydubecký ($15,3 \text{ mg.100g}^{-1}$) a Devín ($13,9 \text{ mg.100g}^{-1}$).

Po srovnání s hodnotami, které byly k dispozici a byly získány stejnou metodou před dvěma lety, bylo zjištěno, že obsah vitamínu C téměř ve všech odrůdách klesl, kromě odrůdy Vydubecký, kde byla naopak zjištěna vyšší koncentrace, což mohlo být zapříčiněno tehdejší špatnou homogenitou rozmělněných plodů nebo vystavení dlouhému působení světla i tepla při přípravě roztoků, a tím mohlo dojít k částečné degradaci kyseliny askorbové.

U jeřábu byly analyzovány odrůdy Běloplodý, Burka, Granatina, Lionora springer, Velved a Titan. Nejvíce vitamínu C bylo jednoznačně zjištěno u bezbarvé odrůdy Běloplodý, jehož obsah byl stanoven na hodnotu 41,3 mg vitamínu C na 100 g plodů, nejméně vitamínu C obsahovala odrůda Titan 2,2 mg vitamínu C na 100 g plodů. U zbylých odrůd se hodnoty obsahu vitamínu C pohybovaly spíše při nižších hladinách a blížili se odrůdě Titan, jen odrůda Lionora springer měla vyšší množství a to 7,8 mg vitamínu C na 100 g plodů.

Dále bylo testováno stanovení celkového vitamínu C po redukci kyseliny dehydroaskorbové na askorbovou. Jako redukční činidlo byl použit dithiothreitol (DTT). Jen v některých případech došlo ke vzrůstu stanovené kyseliny askorbové, v jiných případech se obsah vůbec nelišil či naopak snížil. K lepším výsledkům by bylo zapotřebí vyzkoušet ještě i jiné redukční činidlo, např. TCEP, případně ověřit účinnost redukčních schopností DTT na samotné kyselině dehydroaskorbové, které bohužel, jak TCEP, tak DHA nebyly k dispozici.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ČSN EN 14130: 2004. Potraviny – Stanovení vitamínu C metodou HPLC. Praha: Český normalizační institut, 2004. 14 s.
- [2] MAŘÁKOVÁ, V. *Možnosti využití plodů méně známých keřovin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 35 s. Vedoucí bakalářské práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [3] VĚTVIČKA, Václav; MATOUŠOVÁ, Vlasta. *Stromy a keře*. 2. české vyd. . Praha : Avicenum, 2001. Dřínovité, s. 288. ISBN 80-7151-178-1.
- [4] Obrázek *Cornus mas.* [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <http://nature.hyperlink.cz/flora/Drin_obecnny.htm>.
- [5] Obrázek *Cornus mas.* [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <http://www.orchis.cz/index.php?option=com_content&task=view&id=2559&>.
- [6] BENEDÍKOVÁ, Marie; KYSELÁKOVÁ, Jolana. *Lesnická práce* [online]. 2006 [cit. 2010-04-25]. Vybrané keře našich lesů . Dostupné z WWW: <<http://lesprace.silvarium.cz/content/view/75/45/>>
- [7] Mapa výskytu dřínu obecného v ČR. [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <http://www.lokality-rostlin.cz/?rostlina=cornus_mas>.
- [8] Obrázek pecek dřínu obecného. [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <<http://wwwold.fle.czu.cz/predmety/semena/>>.
- [9] PAPRŠTEJN, František VÝZKUM PĚSTITELSKÝCH TECHNOLOGIÍ U MÉNĚ ROZŠÍŘENÝCH OVOCNÝCH DRUHŮ. *Redakčně upravená závěrečná zpráva*. Hořice : VÝZKUMNÝ A ŠLECHTITELSKÝ ÚSTAV OVOCNÁŘSKÝ HOLOVOUSY s.r.o., 2007 [cit. 2010-04-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.mze-vyzkum-infobanka.cz/DownloadFile/9764.aspx>>.
- [10] Obrázek plodů dřínu obecného. [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <<http://www.stareodrudy.org/img/photo/10.jpg>>.
- [11] Oficiální stránky Kilikia, nabídka produktů. [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <<http://www.kilikia.am/pages-al-products-mode-products-id-5.html>>.
- [12] Oficiální stránky Alibaba, nabídka produktů. [cit.30.3.2010]. Dostupné z: <http://www.alibaba.com/productshowimg/caman-100954846-0/Fructus_Corni_Asiatic_Cornelian_Cherry_Fruit.html>.
- [13] Obrázek jeřáb obecný. [cit.25.4.2010]. Dostupné z: <<http://www.garten.cz/a/cz/2834-sorbus-aucuparia-jerab-obecnny/>>.

- [14] DOLEJŠÍ, Antonín; KOTT, Vladimír; ŠENK, Lubomír. *Méně známé ovoce*. Vydání první. Praha : Brázda, 1991. Jeřáb - Sorbus L, s. 35-44. ISBN 80-209-0188-4.
- [15] Oficiální stránky thedrinkshop, nabídka produktů. [cit.5.5.2010]. Dostupné z: <<http://www.thedrinkshop.com/products/nlpdetail.php?prodid=2964>>.
- [16] BALL, G.F.M. . *Vitamins: Their Role in the Human Body*. London, UK : Blackwll Publishing Ltd, 2004. Vitamin C, s. 394-395. ISBN 0-632-06478-1.
- [17] Obrázek oxidace kyseliny askorbové. [cit. 30. 3. 2010] Dostupné z: <<http://www.ped.muni.cz/WCHEM/comenius2000/vitaminC/struktura.htm>>.
- [18] MANDŽUKOVÁ, J.: *Léčivá síla vitaminů, minerálů a dalších látek*. Benešov: Nakladatelství Start, 2005. 79-84 s. ISBN 80-86231-36-4 (váz.)
- [19] HYNIE, Sixtus. *Speciální farmakologie*. 2. přeprac. vyd. Praha : Karolinum, 2002. Kyselina askorbová (vitamin C), s. 202. ISBN 80-246-0416-7.
- [20] DEUTSCH, John C. Dehydroascorbic acid. *Journal of chromatography A*. 2000, č. 881, s. 299-307.
- [21] VELÍŠEK, J.: *Chemie potravin* 2. 2.vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 29-41s., 113 s., 252-253 s., 263 s. ISBN 80-86659-01-1.
- [22] EITENMILLER, Ronald R.; YE, Lin; LANDEN, JR., W. O. *VITAMIN ANALYSIS FOR THE HEALTH AND FOOD SCIENCES*. Second Edition. Boca Raton : CRC Press, Taylor & Francis Group, 2008. Ascorbic acid: vitamin C, s. 235-271. ISBN 978-0-8493-9771-4.
- [23] SOMMER, L.: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUUM, 2000. 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [24] KLOUDA, Pavel, *Moderní analytické metody*, 2. upravené a doplněné vydání, Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 10 s., ISBN 80-86369-07-2
- [25] OPEKAR, F., Jelínek, I., Rychlovský, P., Plzák, Z.: *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2007. ISBN 978-80-246-0553-1.
- [26] ŠTULÍK, K.: *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004. 264 s. ISBN 80-246-0852-9.
- [27] Oficiální stránky Waters. [cit.1.4.2010]. Dostupné z: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ>.

- [28] Vysoká škola chemicko-technologická [cit. 1. 4. 2010] Dostupné z: <http://web.vscht.cz/kohoutkj/navodVitC%20HPLC%202006.pdf>.
- [29] HÁLKOVÁ, Jana; RUMÍŠKOVÁ, Marie; RIEGLOVÁ, Jana. *Analýza potravin*. 2. vyd.. Újezd u Brna : RNDr. Ivan Straka, 2001. Vitamíny, s. 73. ISBN 80-86494-02-0.
- [30] SILVA, Fabiano O. Total ascorbic acid determination in fresh squeezed orange juice by gas chromatography. *Food Control*. 2005, 16, s. 56.
- [31] G. BRONCOVÁ, T.V. ŠIŠKANOVÁ, M. KRONĎÁK, M. VOSMANSKÁ, P. ŘEZANKA: Coulometrie. Vysoká škola chemicko-technologická. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/4_Coulo.pdf
- [32] DOUŠA, Michal. *HPLC, High Performance Liquid Chromatography* [online]. 1999 [cit. 2010-04-14]. Validační program pro statistické zpracování analytických dat . Dostupné z WWW: <http://hplc.sweb.cz/>.
- [33] MIHALČOVÁ, Janka; DOŠKÁŘOVÁ, Šárka. *Zajištění kvality analytických výsledků*. Český Těšín : 2 Theta, 2002. Sborník přednášek ze seminářů 19. - 21. 3 2001 a 11. - 13. 3. 2002 v Komorní Lhotce, s. 29, 129. ISBN 80-86380-11-4.
- [34] DÖRFFEL, Klaus; ECKSCHLAGER, Karel. *Optimální postup chemické analýzy*. Druhé, doplněné vydání. Praha : SNTL, 1988. Hodnocení analytických výsledků a metod, s. 21.
- [35] SERRANO, Isabel Odriozola; JOVER, Teresa Herná'ndez; BELLOSO, Olga Martí'n. Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chemistry*. 2007, 105, s. 1152.
- [36] PALOVÁ, P. Stanovení obsahu vitamínu C v plodech dřínu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 67 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Milena Vespalcová, Ph.D.
- [37] KOPEC, K.: Tabulky nutričních hodnot ovoce a zeleniny. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2001. 49 s. ISBN 80-86153-64-9

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

HPLC	(high performance liquid chromatography) – vysokoúčinná kapalinová chromatografie
AA	(ascorbic acid) askorbová kyselina
DAA	(dehydroascorbic acid) dehydroaskorbová kyselina
GC	(gas chromatography) – plynová chromatografie
UV	ultrafialové záření
DTT	dithiothreitol
TCEP	tris-[2-carboxyethyl] phosphine

7 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1: Stanovené a vypočtené hodnoty extraktů jednotlivých odrůd dřínu obecného

Příloha č. 2: Vzorky plodů analyzovaných odrůd dřínu

Příloha č. 3: Vzorky plodů analyzovaných odrůd jeřábu

8 PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Stanovené a vypočtené hodnoty extraktů jednotlivých odrůd dřínu obecného

Odrůda	Navážka [g]	Plocha píku	Průměrná hodnota plochy píku	Koncentrace vitamínu C [mg.100g ⁻¹]
Vydubecký	5,8362	2111918	2185595	15,3
		2245970		
		2198898		
	5,8501	2309795	2310723	
		2312044		
		2310329		
	5,1879	2140207	2187974	
		2227837		
		2195879		
Sejanec gruševidnovo	4,7409	514362	541324	3,7
		593566		
		516044		
	5,8443	596417	582124	
		581464		
		568492		
	6,2867	476822	476795	
		475006		
		478558		
Elegantní	4,1304	894761	901783	8,3
		888888		
		921701		
	4,1080	800891	824926	
		829781		
		844107		
	4,4880	978800	998605	
		966420		
		1050596		
Jolico	6,2552	4470366	4470366	22,7
		4449742		
		4427186		
	5,8698	3025168	2872969	
		2740606		
		2853134		
	5,7395	3280112	3261168	
		3236654		
		3266738		

Odrůda	Navážka [g]	Plocha píku	Průměrná hodnota plochy píku	Koncentrace vitamínu C [mg.100g ⁻¹]
Vyšegorodský	6,2139	1249787	1234394	7,1
		1217281		
		1236115		
	6,1150	1216910	1101298	
		1050677		
		1036308		
	6,3024	1080798	1104483	
		1100272		
		1132379		
Devín	4,4740	1777846	1834001	13,9
		1855544		
		1868614		
	4,6615	2589776	2240989	
		2076984		
		2056208		
	5,4688	1031858	1043143	
		1063526		
		1034046		
Fruchtal	4,3837	3394032	3489523	26,1
		3534968		
		3539568		
	4,3019	2247548	2491132	
		2531312		
		2694536		
	4,9110	3194792	3201605	
		3165028		
		3244996		
Lukjanovský	4,4619	505663	486890	3,8
		450903		
		504105		
	4,6020	475203	476351	
		497301		
		456551		
	4,2420	334126	362140	
		407402		
		344892		
Olomoucký	4,8896	703619	695268	7,3
		711487		
		670699		
	4,9886	1272953	1252502	
		1229732		
		1254822		
	5,1637	907101	916279	
		923832		
		917903		

Příloha č. 2: Vzorky plodů analyzovaných odrůd dřínu

Devín



Elegantní



Fruchtal



Jolico



Lukjanovský



Olomoucký



Sejanec Gruševidno



Vydubecký



Vyšegorodský



Příloha č. 3: Vzorky plodů analyzovaných odrůd jeřábu

Běloplodý



Burka



Granatina



Lionora Springer



Titan



Velved

